

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AISSAR EDUARDO NASSIF

**ANÁLISE DO VALOR PROGNÓSTICO DOS MARCADORES IMUNO-
HISTOQUÍMICOS P27, MIB1 E CD34 NO CARCINOMA DE
PRÓSTATA LOCALIZADO**

CURITIBA

2009

AISSAR EDUARDO NASSIF

**ANÁLISE DO VALOR PROGNÓSTICO DOS MARCADORES IMUNO-
HISTOQUÍMICOS P27, MIB1 E CD34 NO CARCINOMA DE
PRÓSTATA LOCALIZADO**

**Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor ao Programa de
Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de
Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Paraná**

Orientador: Prof. Dr. Renato Tambara Filho

**Coordenador: Prof. Dr. Antônio Carlos L.
Campos**

CURITIBA

2009

A Deus, por tudo.

Aos meus pais, Eduardo e Maria Tereza,
pelo carinho, paciência, amor e dedicação
em todos os momentos de minha vida.

A minha amada esposa Priscila,
fonte de luz contínua a iluminar meu caminho.

À minha família Duda, Mário, Frederico, Maria Eduarda,
Wolf, Inês, Rique, por toda ajuda
e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À CAPES e à Pós-Graduação em Princípios de Cirurgia da Universidade Federal do Paraná na pessoa de seus coordenadores: Prof. Dr. Antônio Carlos L. Campos, Prof. Dr. Jorge F. Mathias e Prof. Dr. Osvaldo Malafaia, pela oportunidade de crescimento científico.

Ao Prof. Dr. Renato Tambara Filho, exemplo de vida e orientador deste trabalho, pela constante porta aberta, pelos conselhos e amizade.

A Sra. Ângela Mattos pelo apoio e orientação na estatística deste trabalho, e a Dra. Regina Xavier Gomes de Paula pela leitura das lâminas e co-orientação na pesquisa.

Ao Dr. Hélio J. Pozzobon, Édison Azevedo e Willian Taguchi pelo apoio e incentivo nestes últimos anos.

A Dra. Paola Souza do Laboratório de Anatomia Patológica Souza e Dr. Alex Pimenta do Laboratório de Anatomia Patológica São Camilo pelo apoio durante a coleta de dados.

A Uningá e aos professores Ricardo Benedito de Oliveira, Ney Stival, Gervásio Cardoso dos Santos, Edson Arpini e João Batista Ruggeri pelo apoio e incentivo.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*"Eu quero saber como Deus criou este mundo.
Não estou interessado neste ou naquele fenômeno,
no espectro deste ou daquele elemento.
Eu quero conhecer os pensamentos Dele,
o resto são detalhes."*

Albert Einstein

RESUMO

INTRODUÇÃO: A neoplasia prostática é a mais incidente nos homens, apresentando um curso clínico variável. Procuram-se métodos que melhor identifiquem estas variáveis, melhorando a acurácia prognóstica e facilitando a escolha do tratamento. **OBJETIVOS:** Avaliar a expressão imuno-histoquímica do MIB-1, CD34 e p27 no carcinoma localizado de próstata. Correlacionar a expressão desses marcadores com PSA, escore de Gleason, e estágio patológico; e analisar os fatores envolvidos com recidiva tumoral. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram estudados 100 pacientes submetidos à prostatectomia radical com doença localizada (T1c a T2c), cujos blocos histológicos foram analisados e submetidos ao preparo imuno-histoquímico para os três marcadores. **RESULTADOS:** Dos 100 pacientes, 26 % recidivaram num seguimento médio de $36,7 \pm 18,8$ meses. A recidiva estava relacionada de forma significativa com o PSA ($p=0,002$), escore de Gleason ($p=0,006$), estágio patológico ($p<0,0001$) e com a maior expressão do CD34 na área tumoral ($p=0,025$). A expressão tecidual foi negativa: 63% e 40% respectivamente para o MIB-1 e p27. O MIB-1 e o CD34 correlacionaram-se com o PSA, escore de Gleason, estadiamento patológico e com maior chance de recidiva. O p27 correlacionou-se apenas com o escore de Gleason. **CONCLUSÃO:** O MIB-1 e o CD34 mostraram-se, similares aos fatores prognósticos essenciais, preditores para a recidiva da doença.

Palavras chave: Neoplasias prostáticas. Prognóstico. Cirurgia. MIB-1. CD34. P27.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Prostate cancer is the most frequent in men, with a variable clinical course. We are searching for methods to better identify these variables, improving prognostic accuracy and facilitating the choice of treatment. **OBJECTIVES:** To evaluate the immuno-histochemical tissue expression of MIB-1, CD34 and p27 in localized prostate carcinoma. To correlate the expression of these markers with: PSA, Gleason score and pathological stage, and analyze the factors involved with tumor relapse. **MATERIAL AND METHODS:** We studied 100 patients who went radical prostatectomy with localized disease (T1c to T2c). The surgical specimens were properly prepared and evaluated for expression of three markers immuno-histochemical. **RESULTS:** Of the 100 patients, 26% relapsed in a median follow up of 36.7 ± 18.8 months. The relapse was related significantly with PSA ($p = 0.002$), Gleason score ($p = 0.006$), pathological stage ($p < 0.0001$) and with the highest expression of CD34 in tumor area ($p = 0.025$). The tissue expression was negative in 63% and 40% respectively for the MIB-1 and p27. The MIB-1 and CD34 correlated with the PSA, the Gleason score and pathological stage and with greater chance of relapse. The p27 correlated only with the Gleason score. **CONCLUSION:** The MIB-1 and CD34 showed up, similar to the key prognostic factors, to be predictors for disease relapse.

Key words: Prostate neoplasm. Prognostic. Surgery. MIB-1. CD34. P27.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	MIB-1 EM ÁCINOS NEOPLÁSICOS (ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA ACINAR USUAL), 200X.....	31
FIGURA 2	ADENOCARCINOMA COM NÚCLEOS MARCADOS PELO ANTICORPO P27 – 100X/600X.....	32
FIGURA 3	CÉLULAS ENDOTELIAIS MARCADAS PELO ANTICORPO CD34 - 100X.....	33

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES POR GRUPO DE PSA.....	35
GRÁFICO 2	EXPRESSÃO DO MARCADOR MIB-1.....	36
GRÁFICO 3	EXPRESSÃO DO MARCADOR P27.....	37
GRÁFICO 4	CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DO MARCADOR CD34 NORMAL E TUMOR.....	37
GRÁFICO 5	CORRELAÇÃO ENTRE O PSA E O MARCADOR CD34 - ÁREA TUMOR.....	41
GRÁFICO 6	CORRELAÇÃO ENTRE O ESCORE DE GLEASON E O MARCADOR CD34 – TUMOR.....	41

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA AVALIAÇÃO DEMOGRÁFICA DOS PACIENTES ESTUDADOS.....	35
QUADRO 2	AVALIAÇÃO DOS DADOS EM RELAÇÃO AO MARCADOR MIB1.....	38
QUADRO 3	CORRELAÇÃO DOS DADOS EM RELAÇÃO AO MARCADOR P27.....	39
QUADRO 4	ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS DADOS EM RELAÇÃO AO MARCADOR P27.....	40
QUADRO 5	ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA EVOLUÇÃO DO PSA, ESTADIAMENTO PATOLÓGICO E DO MARCADOR P27 EM RELAÇÃO O MARCADOR CD34 - ÁREA TUMOR.....	42
QUADRO 6	ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS DADOS EM RELAÇÃO A EVOLUÇÃO DO PSA.....	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	OBJETIVOS.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	CÂNCER DE PRÓSTATA E GENÉTICA.....	15
2.2	EPIDEMIOLOGIA.....	16
2.3	FATORES DE RISCO.....	17
2.4	PATOLOGIA.....	18
2.4.1	Tipos histológicos.....	18
2.4.2	Fatores prognósticos em câncer de próstata localizado.....	18
2.4.2.1	Essenciais.....	18
2.4.2.2	Adicionais.....	21
2.4.2.3	Promissores.....	22
2.5	IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	23
2.5.1	MIB-1.....	23
2.5.2	P27.....	25
2.5.3	CD34.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	29
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
3.2.1	Critérios de inclusão.....	29
3.3	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	30
3.4	COLORAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA E AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA.....	29
3.5	SEGUIMENTO DOS PACIENTES.....	33
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4	RESULTADOS.....	35
4.1	AVALIAÇÃO.....	35
4.2	EXPRESSÃO DOS MARCADORES.....	36
4.2.1	Marcador MIB-1.....	36
4.2.2	Marcador P27.....	36

4.2.3	Marcador CD34 (área) - normal x tumor.....	37
4.3	ANÁLISE DOS MARCADORES.....	38
4.3.1	Marcador MIB-1.....	38
4.3.2	Marcador P27.....	39
4.3.3	CD 34.....	40
4.4	EVOLUÇÃO DO PSA (PSA - CONTROLE OU RECIDIVA).....	42
5	DISCUSSÃO.....	44
5.1	EXPRESSÃO DE MIB-1.....	44
5.2	EXPRESSÃO DE P27.....	46
5.3	EXPRESSÃO DE CD34 / MICRODENSIDADE VASCULAR.....	47
6	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	APÊNDICES.....	63
	ANEXOS.....	70

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de próstata é o tipo de câncer mais frequentemente diagnosticado e a segunda causa de morte relacionada a câncer na população; sua incidência tende a crescer nas próximas décadas com o aumento da expectativa de vida (ERCOLE *et al.*, KUO; LIN; LEE, 2008; WILT *et al.*, 2008b). No mundo, o número de casos novos diagnosticados de câncer de próstata é de aproximadamente 543 mil casos por ano, o que representa 15,3% de todos os casos incidentes de câncer em países desenvolvidos e 4,3% dos casos em países em desenvolvimento (BRASIL, 2008).

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer previu 49.530 novos casos em 2008, o que corresponde a um risco estimado de 52 casos novos a cada 100 mil homens, sendo mais frequente nas regiões sul e sudeste do país (BRASIL, 2008).

O advento do PSA (*prostate specific antigen*), no fim da década de 80, associado a avanços na biologia molecular e identificação dos fatores de risco como por exemplo, história familiar e nível de testosterona, permitiram um maior conhecimento do comportamento biológico desta neoplasia (ARAP, 2003).

O câncer de próstata é uma doença com potencial de cura através da cirurgia (WILT *et al.*, 2008a), radioterapia e outros métodos ou combinações de métodos, podendo em casos selecionados ser submetido à vigilância clínica (ERCOLE *et al.*, 2008; STATTIN *et al.*, 2008). Entretanto, esses tratamentos são efetivos para doença localizada; as recorrências sugerem sub-estadiamento ou a tendência a metastatizar ainda em fases iniciais (ARLEN *et al.*, 2008). Baseado nestas evidências, associado à alta incidência desta doença, justificam-se esforços na busca do aperfeiçoamento de métodos de detecção precoce e de marcadores prognósticos, com a consequente melhora no planejamento terapêutico (FREEDLAND; KRUPSKI; MOUL, 2006; DHAM *et al.* 2008; SCALE; DAHM, 2008).

Apesar da expansão dos conhecimentos epidemiológicos e biomoleculares do câncer de próstata, não se pode prever quais pacientes irão desenvolver morbidade clinicamente significativa e quais permanecerão com tumor confinado ao órgão (KLEIN *et al.*, 2008; NEAL *et al.* 2008; SIMONE *et al.*, 2008).

Nas neoplasias prostáticas, a análise histopatológica tem grande relevância clínica (LISKA *et al.*, 2007; BILLIS *et al.*, 2008). Exames histológicos e sorológicos descrevem aspectos muito importantes, possibilitando o monitoramento da evolução

da doença (FREEDLAND; MOUL, 2007; ARLEN *et al.*, 2008). Contudo, os métodos imuno-histoquímicos quando analisados de forma qualitativa, têm apresentado grande disparidade e variabilidade de resultados entre diferentes observadores (FREEDLAND *et al.* 2003; RHODES *et al.*, 2003; DOGANAVSARGIL *et al.*, 2006). Assim, a fim de prover uma escala numérica e reprodutível dos padrões de marcação dos tecidos, aumentando a sensibilidade e o controle de qualidade das análises, tem-se buscado cada vez mais refinamentos tecnológicos através de métodos automatizados (DHIR *et al.*, 2008).

Inúmeros trabalhos vêm identificando novos marcadores prognósticos: de proliferação celular, receptores de membrana associados à adesão, à angiogênese, modificação nos níveis dos proto-oncogenes, desvendando como os distúrbios celulares convergem para formação das neoplasias e predizendo a tendência de agressividade e a produção de metástases (BANERJEE *et al.*, 2003; RHODES *et al.*, 2003; LINE *et al.*, 2005; ANANTHANARAYANAN *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2007; VIEWEG *et al.*, 2008).

A criação de painéis prognósticos utilizando-se da imuno-histoquímica facilitará a categorização dos tumores, compreendendo melhor sua evolução e facilitando a escolha terapêutica. Quando for possível identificar variáveis biológicas envolvidas neste processo, poderá se realizar uma vigilância nos pacientes predispostos, aumentando a cura e a sobrevida, reduzindo-se os índices de recidiva tumoral (GRIGNON *et al.*, 1997; JIN *et al.*, 2005; MOHAPATRA *et al.*, 2005; CONCATO *et al.*, 2007). Muitos trabalhos vêm demonstrando a importância de novos marcadores imuno-histoquímicos de proliferação como o p27, CD34 e MIB-1, muitos deles já são empregados rotineiramente, servindo como preditores do prognóstico e da evolução dos tumores (DOGANAVSARGIL *et al.*, 2006; FREEDLAND; MOUL, 2007).

1.1 OBJETIVO

- 1- Analisar a expressão imuno-histoquímica dos marcadores p27, CD34 e MIB-1, em pacientes com adenocarcinoma de próstata clinicamente localizado.
- 2- Correlacionar a expressão desses marcadores com os fatores prognósticos essenciais: PSA, Gleason e Estadio patológico.
- 3- Correlacionar a recidiva tumoral com os fatores prognósticos usuais e com a expressão dos marcadores p27, CD34 e MIB-1.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER DE PRÓSTATA E GENÉTICA

Estima-se que, apesar de 42% dos homens apresentarem carcinoma de próstata diagnosticado através da autópsia, apenas 9,5% irão desenvolver a forma clínica da doença e 2,9% irão morrer devido ao câncer. Desta maneira, o desenvolvimento de testes prognósticos é essencial na identificação daqueles pacientes com susceptibilidade ao desenvolvimento do carcinoma de próstata, que poderão ser beneficiados por uma maior vigilância antes da manifestação da doença. Enquanto a maioria dos cânceres de próstata é de manifestação esporádica, existem casos de manifestação familiar com um risco aumentado para parentes de indivíduos afetados na população americana (KUO; LIN; LEE, 2008).

Análises de segregação do carcinoma de próstata sugerem a ocorrência de pelo menos um loco principal de susceptibilidade, que seria responsável pela ocorrência de aproximadamente 10% dos casos de carcinoma de próstata (SHAND; GELMANN, 2006). Pelo menos seis locos de susceptibilidade já foram mapeados através de estudos de ligação. Além destes possíveis genes de susceptibilidade, acredita-se que alterações em outros genes podem ser associadas com o risco e/ou progressão deste tipo de tumor em casos familiares e isolados (LUGUETTI, 2001).

Evidências sugerem que a manifestação do carcinoma de próstata depende de fatores ambientais e de componentes genéticos. Uma destas evidências é a ocorrência de casos familiares de carcinoma de próstata, os quais representam cerca de 10% do total de casos da doença. Carter *et al.* (1993) demonstraram que a idade de início precoce e a ocorrência de vários acometidos na família são determinantes no risco da recorrência. Estudos com familiares de câncer de próstata demonstraram que parentes em primeiro grau de um homem acometido, apresentam um risco duas a três vezes maior de desenvolver este tipo de câncer, independente do grupo racial. Outros estudos demonstraram que quando há mais de um caso na genealogia, o risco para os demais homens aumenta cerca de 1,8 vezes (STEIMBERG *et al.*, 1990; GLOVER *et al.*, 1998; SHAND; GELMANN, 2006).

O modelo de herança é complexo, sendo que alguns estudos sugerem um padrão de herança autossômica dominante (CARTER *et al.*, 1993). Porém, o modelo multifatorial é o mais aceito para a maioria dos casos. Atualmente, podemos dividir

os estudos genéticos em dois subgrupos: a) identificação de anormalidades cromossômicas e alterações de expressão genética nas células de tumor de casos isolados ou familiares que podem levar a caracterização dos mecanismos genéticos envolvidos no desenvolvimento da neoplasia; b) identificação de genes que estejam associados à susceptibilidade dessa neoplasia.

2.2 EPIDEMIOLOGIA

O número de casos novos diagnosticados de câncer de próstata é de aproximadamente 543 mil casos por ano/mundo, o que representa 15,3% de todos os casos incidentes de câncer em países desenvolvidos e 4,3% dos casos em países em desenvolvimento (BRASIL, 2008). O câncer de próstata é o mais prevalente em homens, com uma estimativa de 1,5 milhões com diagnóstico nos últimos cinco anos acometendo uma população com 85% homens casados e 43% formalmente empregados (RAMSEY *et al.*, 2007). O risco de desenvolver a doença ao longo de toda a vida é de 17,6% para homens brancos e de 20,6% para homens negros (PENSON; CHAM, 2007; ELLIOT; SHINGHAL; PRESTI JR, 2008).

Observa-se maior incidência e mortalidade no grupo dos negros, enquanto que as menores taxas são encontradas em grupos de origem asiática; neste grupo ocorre rápida ascensão, quando comparada com os demais cânceres (PENSON *et al.*, 2007; ELLIOT; SHINGHAL ; PRESTI JR, 2008 ; SONG *et al.*, 2008). As maiores taxas de incidência encontram-se na América do Norte, Austrália e países escandinavos (provavelmente devido ao rastreamento), além da parte sul da América do Sul, Caribe e na África sub-Saária. As menores taxas de incidência são encontradas no norte da África e na Ásia, particularmente na China, com uma taxa de 1,08/100.000. A maior parte dos casos novos de câncer de próstata ocorre nos países desenvolvidos. Mais do que qualquer outro tipo de câncer, este é considerado o câncer da terceira idade, uma vez que cerca de três quartos dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos (BRASIL, 2008). O custo americano para o tratamento vem crescendo acima de 30% na última década, representando 1,3 bilhões de dólares em 2000, e 2,1 bilhões de dólares em pesquisas em 2005 (PENSON *et al.*, 2007; THOMPSON *et al.*, 2007).

O número de casos novos de câncer de próstata estimados para o Brasil, no ano de 2008, é de 49.530. Esses valores correspondem a um risco estimado de 52

casos novos para cada 100 mil homens. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de próstata é o mais freqüente em todas as regiões, com risco estimado de 69/100.000 na Sul, 63/100.000 na Sudeste, 47/100.000 na Centro-Oeste, 38/100.000 na Nordeste, e 22/100.000 na Norte (BRASIL, 2008).

2.3 FATORES DE RISCO

Apesar das causas específicas da iniciação e progressão do câncer de próstata serem desconhecidas, evidências apontam para fatores genéticos e ambientais na etiologia da doença (LINDSTROM *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2006). No momento, o fator de risco mais importante na progressão é a ação dos andrógenos. Vários estudos tentaram determinar a relação exata entre os níveis de andrógeno e o risco de desenvolvimento da doença. Houve dificuldade na interpretação dos dados que demonstraram resultados conflitantes devido a fatores como: variação circadiana do nível androgênico e dificuldade de se determinar a real exposição da próstata aos hormônios (; NELSON *et al.*, 2007; HUSSAIN *et al.*, 2008; RODDAM *et al.*, 2008; SHARIAT *et al.*, 2008 a/b).

Acredita-se que outros fatores ambientais também têm papel significativo no risco de desenvolvimento de câncer de próstata (STAMEY; MCNEAL; YEMOTO, 1999; HAMILTON; FREDLAND, 2008; VAN PATTEN; DE BOER; GUNS, 2008). A maior evidência disso vem de estudos de migração, que mostraram aumento na sua incidência em imigrantes japoneses e chineses de primeira geração (SONG *et al.* 2008). Entre os fatores até o momento estudados não se pode correlacionar as diferentes intervenções dietéticas (baixo teor de gordura, ricas em fito-estrogênios e vegetariana) e as suplementações alimentares (licopeno, zinco, selênio, vitamina E, fito-estrogênios) com a evolução da neoplasia (VAN PATTEN; DE BOER; GUNS, 2008). Vários outros fatores como, por exemplo, atividade sexual, tabagismo, alcoolismo e vasectomia foram estudados, mas nenhum deles apresentou relação consistente com o risco de desenvolvimento da doença (HOLT; SALINAS; STANFORD, 2008).

2.4 PATOLOGIA

2.4.1 Tipos histológicos

O adenocarcinoma é o tipo histológico mais freqüente de câncer de próstata, sendo diagnosticado em mais de 90% dos casos. Outros tipos celulares são incomuns, como carcinoma de células transicionais, que representam 1 a 4% dos tumores prostáticos; os sarcomas, que representam 0,1 a 0,2%; e os linfomas e leucemias, estes ainda mais raros (LISKA *et al.*, 2007).

2.4.2 Fatores prognósticos em câncer de próstata localizado

Em relação à sua relevância, os fatores prognósticos têm sido divididos em três grupos distintos: essenciais, adicionais e promissores.

2.4.2.1 Essenciais

Estes fatores são fundamentais para a tomada de decisão em relação ao tratamento. Três deles são atualmente considerados essenciais na avaliação prognóstica da doença: o estadiamento, PSA e o grau histológico. A combinação destas três variáveis determina uma melhor capacidade de prognóstico do que a análise de qualquer uma delas isoladamente (TRUE *et al.*, 2006).

Estadiamento – TNM

A extensão anatômica do tumor é o fator de prognóstico mais importante e mais amplamente utilizado. A classificação TNM é aceita internacionalmente para descrever e comparar padrões de apresentação da doença, impacto do rastreamento e acesso ao tratamento, criando uma linguagem universal e proporcionando uma padronização na indicação do tratamento.

Os objetivos principais no estadiamento do câncer de próstata são prever o prognóstico e facilitar a escolha da terapia, esta baseada principalmente na extensão da doença, o que pode ser estabelecido quando correlacionado aos nomogramas. O sistema TNM (*Tumor-Nodes-Metastasis*) utilizado para o estadiamento da patologia na atualidade foi modificado em 1997 e em 2002 pela

União Internacional Contra o Câncer (UICC) (PARTIN *et al.*, 1990; PARTIN *et al.*, 1993; PARTIN *et al.*, 2001).

O toque ou exame digital retal é um exame utilizado para avaliação da extensão local do câncer, sendo parte integrante do estadiamento clínico (PARTIN *et al.*, 2001). A sensibilidade de predizer doença restrita ao órgão é de cerca de 50% e a especificidade é de 80% (PARTIN *et al.* 1990; RESS; RESNICK; OESTERLING, 1997).

PSA (*Prostate specific antigen*)

O PSA é marcador tecidual, porém não tumor específico. É uma glicoproteína de baixo peso molecular (33 kDa), da família das calicreínas, sendo excretada pelos ductos prostáticos para luz uretral como parte do plasma seminal. Pequena fração atravessa a membrana basal e alcança a circulação. Suas sensibilidade e especificidade não permitem a utilização do mesmo como método isolado. Houve aumento drástico no diagnóstico do número de tumores bem ou moderadamente diferenciados não palpáveis ao toque retal; permitindo com este diagnóstico mais precoce um maior índice de cura ou mesmo possibilitando colocar estes pacientes em vigilância clínica (KVALE *et al.*, 2007; STATTIN *et al.*, 2008).

Na avaliação da doença primária, existem algumas informações que o valor de PSA pode fornecer: em pacientes com PSA < 4 ng/ml há 80% de probabilidade de a doença estar restrita ao órgão, nos casos com PSA < 10 ng/ml a cintilografia óssea e tomografia computadorizada da pelve são desnecessárias devido ao baixo risco de metástases à distância. Para situações com PSA > 10 ng/ml o risco de extensão extra-capsular é acima de 60% e para PSA > 50 ng/ml há risco altamente significativo de doença metastática à distância (CORREA *et al.*, 2006).

O PSA tem sido usado no rastreamento do câncer de próstata e é responsável, em grande parte, pelo aumento da detecção da doença. Tem sido questionado se um valor de PSA maior ou igual a 2,5 ng/ml deveria ser considerado anormal, pois descreve-se uma incidência de câncer entre 22% e 25% em homens com valores de PSA entre 2,5 e 4.0 ng/ml (STATTIN *et al.*, 2008).

A concentração sérica de PSA é utilizada na monitorização do tratamento, sendo que cerca de 30 dias após a prostatectomia radical os níveis de PSA total devem atingir valores próximos a zero. Eventuais elevações após a prostatectomia

podem ser decorrentes à presença de tecido benigno remanescente. Considera-se como sinais de provável recidiva local os níveis detectáveis de PSA após um ano de procedimento cirúrgico, com duplicação superior a 10 meses e velocidade de duplicação menor que 0,75 ng/ml por ano (TEETER *et al.*, 2008).

Níveis detectáveis de PSA após prostatectomia radical estão associados com recorrência da doença em muitos pacientes, sendo que o intervalo médio entre a recorrência do PSA e a morte por câncer situa-se entre cinco e 12 anos, dependendo do escore de Gleason (DHAM *et al.*, 2008).

Quando se define recidiva tumoral, a elevação do PSA ou recidiva bioquímica pode ser considerada um fator prognóstico para progressão da doença. Aproximadamente um terço dos pacientes submetidos à prostatectomia radical apresentará PSA detectável no seguimento de 10 anos (POUND *et al.*, 1999; HAN *et al.*, 2003). Existem diferentes definições para a recidiva bioquímica, sendo que o valor sérico entre 0,2 a 0,4 ng/ml é usado como ponto de corte. (COOKSON *et al.*, 2007).

Escore de Gleason

A graduação no sistema Gleason, que é a mais utilizada atualmente, baseia-se na diferenciação glandular e no padrão de crescimento em relação ao estroma (GLEASON *et al.*, 1974; BILLIS *et al.*, 2008). Neste sistema, não se consideram as atipias nucleares e, até hoje, não foi demonstrado superioridade da avaliação nuclear em relação ao padrão glandular no adenocarcinoma da próstata (STAMEY; MCNEAL; YEMOTO, 1999; PAN *et al.*, 2000). De acordo com este sistema, o grau histológico poderá ser de 1 a 5 e a contagem final de 2 a 10. A presença de padrão de Gleason 4 ou 5 é praticamente preditivo de pior evolução (EPSTEIN; CARMICHAEL; PARTIN, 1994; FERGUSON *et al.*, 1995). Ao contrário dos demais sistemas consideram-se tanto o padrão predominante como o padrão secundário (BILLIS *et al.*, 2008).

O escore de Gleason correlaciona-se com a extensão da doença, particularmente com o risco de acometimento extra prostático, assumindo valor prognóstico independente (BILLIS *et al.*, 2008). Considera-se que tumores com escore de Gleason igual ou maior que 7 são biologicamente agressivos, com escore de 5 ou 6 são tumores com agressividade intermediária, e tumores com escore

situado entre 2 e 4 têm agressividade biologicamente menor (KRAHN; NAM; JEWETT, 1998).

2.4.2.2 Adicionais

Os fatores prognósticos adicionais permitem refinamentos na análise dos resultados, porém não são normalmente utilizados no processo de seleção do tratamento.

Exames histológicos mais detalhados

Ajudam na precisão do prognóstico e incluem o número de fragmentos de biópsias positivas, a porcentagem de tumor na biópsia e os índices de proliferação tumoral, tais como porcentagem das células em fase S, expressão de Ki-67 ou de antígenos MIB-1 e PCNA.

Volume tumoral

O volume do câncer prostático é fator importante que se correlaciona com o prognóstico e também com o grau histológico (RAMPERSAUD *et al.*, 2008). Entretanto, os tumores não precisam atingir grandes volumes ou altos graus histológicos antes de se tornarem localmente invasivos. Segundo MCNEAL *et al.*(1992), a penetração capsular inicia-se quando o tumor excede $0,5\text{ cm}^3$, sendo frequente quando o tumor é maior que $1,4\text{ cm}^3$. Embora este volume possa ser uma variável importante no prognóstico, é de difícil mensuração, sendo que muitos tumores podem evoluir rapidamente a partir de pequenas alterações histológicas e outros podem se tornar agressivos após muitos anos, atingindo grandes volumes (PARTIN *et al.*, 1990).

O percentual de envolvimento tumoral é um importante preditor de progressão bioquímica, podendo ajudar na estratificação dos grupos patológicos, bem como ajudar na indicação das terapias adjuvantes (RAMPERSAUD *et al.*, 2008).

4.2.2.3 Promissores

Estes fatores prognósticos representam no momento, uma nova forma de entender a biologia tumoral, porém ainda apresentam evidências incompletas para serem consideradas variáveis independentes. Eles não são comumente utilizados, mas poderão ter aplicações num futuro próximo. A compreensão das diferentes expressões genéticas poderá levar ao melhor entendimento da diferença na produção das proteínas e dos metabólitos, permitindo o aumento na acurácia diagnóstica (RAFTERY; GOWDA, 2008).

Expressão de HER-2/neu – A proteína HER-2/neu é homóloga ao receptor do fator de crescimento epitelial, tendo um gene que a codifica e que está localizado no cromossomo 17q. O aumento da sua expressão varia de 20% a 29% em pacientes submetidos à prostatectomia radical e alcança de 67% a 85% em pacientes previamente tratados com ablação androgênica (GU *et al.*, 1996; FOSSA *et al.*, 2002; JORDA *et al.*, 2002; LARA *et al.*, 2002; MORRIS; REUTER; KELLY, 2002).

O **p53** - O gene responsável pela proteína p53 está localizado no braço curto do cromossomo 17, é reconhecido como uma das mais freqüentes mutações genéticas em todos os tipos de câncer (STACKHOUSE *et al.*, 1999; GRIGNON *et al.*, 1997; LEIROS *et al.*, 2005). As alterações nesta proteína seriam um fator de previsão de recorrência tumoral que ocorrem num percentual de 3% a 79% dos casos de tumores prostáticos (JIN, 2005; MOHAPTRA *et al.*, 2005; CORREA *et al.*, 2006; KAUR; AGARWAL, R.; AGARWAL, C., 2006; ZHAO *et al.*, 2006).

Expressão do gen EZH2 – É um marcador tecidual expresso em câncer de próstata metastático refratário a hormônio. A sua expressão desregulada pode estar envolvida na progressão do câncer, sendo um marcador que distingue tumores indolentes daqueles com risco letal de progressão (RHODES *et al.*, 2003).

O **oncogene c-erbB-2** está localizado no cromossomo 17q11-q21 (POPESCU; KING; KRAUS, 1989) e codifica uma proteína receptora transmembrana semelhante ao receptor do fator de crescimento epidérmico (BARGMANN; HUNG; WEINBERG, 1986). A presença de super-expressão dessa onco-proteína é associada a pior prognóstico (PRESS *et al.*, 1997). Alguns autores têm reportado aumento da expressão do gene tanto em lesões pré-malignas como

em neoplasias invasoras prostáticas (MYERS *et al.*, 1994; SIGNORETTI *et al.*, 2000).

E-caderina - É molécula de adesão celular cuja perda de expressão pode ser o evento principal no caráter invasivo de muitos tumores epiteliais (ANNICOTTE *et al.*, 2006). Há evidências que apontam esta molécula como importante determinante do potencial metastático e que pode predizer a progressão tumoral após o tratamento definitivo do câncer da próstata (BREWSTER *et al.*, 1999, KÖKSAL *et al.*, 2002; KUEFER *et al.*, 2003; JAGGI *et al.*, 2005). Estudos prévios têm mostrado que a expressão da E-caderina está reduzida em grande parte dos cânceres de próstata, principalmente em tumores mais indiferenciados. A expressão da E-caderina correlaciona-se inversamente com o grau tumoral, estadio, metástases, recorrência e sobrevida no câncer de próstata (ROSS *et al.*, 1994; DE MARZO *et al.*, 1999b; WU *et al.*, 2003; WHEELLOCK, 2003).

Kalicreína – É especificamente produzida pelas células epiteliais prostáticas. Ela é altamente expressa em tumores de alto grau, podendo predizer o resultado da biópsia em homens com PSA elevado (DE MARZO *et al.*, 1999a; VICKERS *et al.*, 2008).

Existem outros marcadores em estudo no câncer prostático como o PCA3 urinário (WHITMAN *et al.*, 2008), proteína mielóide 14 na urina e plasma (MULLER *et al.*, 2008), expressão imuno-histoquímica tecidual da proteína ribossomal L19 (BEE *et al.*, 2006) e PCA-1 (KONISHI *et al.*, 2005), expressão gênica NAG-1 (ELLING *et al.*, 2006), localização nuclear NF-kB (LESSARD *et al.*, 2003).

2.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA

2.5.1 MIB-1

O Ki-67, proteína nuclear com peso molecular que oscila entre 345 e 395 kDa, é uma das várias proteínas reguladoras do ciclo celular que podem ser analisadas através da imuno-histoquímica (GERDES *et al.*, 1991 e COOPER *et al.*, 1998). É uma proteína ligante de DNA, que é expressa em todas as fases do ciclo celular, porém indetectável nas células em repouso (GUILLAUD; DU MANOIR; SEIGNEURIN, 1989; GERDES *et al.*, 1991). O anticorpo monoclonal MIB-1, é um dos anticorpos que analisam o índice de positividade desta proteína, que é considerada

como fator prognóstico independente em diversas neoplasias (OJEA CALVO et al., 2004; FENELEY et al., 1996).

Ao contrário do antígeno nuclear proliferação celular (PCNA), que não só tem um papel na replicação do DNA, mas também de reparação do DNA, Ki-67 é praticamente restrita ao seu papel como um antígeno de proliferação, tornando-o mais específico como determinante da fração de crescimento. Catoretti et al. em 1992 e Cher et al. em 1995 definiram o papel inicial do antígeno Ki-67, e sua avaliação pela fração MIB-1, e demonstraram a possibilidade da utilização de material em parafina armazenado por até cerca de 60 anos (CATTORETTI et al., 1992).

O índice Ki-67 (fração do Ki-67 nuclear positiva à imuno-histoquímica) encontra-se mais alto nos carcinomas do que nas glândulas hiperplásicas (MUCCI et al., 2000; ANANTHANARAYANAM et al., 2006; TAMBOLI et al., 1996; CLAUDIO et al., 2002; PEGORETTO, 2008).

Diversas séries da literatura com grande casuística cirúrgica: Bettencourt et al. (1996), Aaltomaa et al. (1997) e Stattin et al. (1997) observaram a correlação significativa do marcador MIB-1 positivo com: grau nuclear, escore de Gleason e estágio patológico, bem como descreveram que o MIB-1 em conjunto com PSA e estágio patológico aumentavam a probabilidade de progressão mais precoce e uma menor taxa de sobrevida livre de doença em 5 anos; sendo um fator prognóstico independente de sobrevida e podendo estabelecer uma melhor correlação de prognóstico dentro das categorias de risco.

Outros estudos, entre eles o realizado por Sebo et al. (2002), mostrou que o MIB-1 em associação com o escore de Gleason ≥ 7 e a invasão perineural foram significativamente associados a progressão da doença; e que o aumento de uma unidade do índice MIB-1 de proliferação representaria um aumento de 64% no risco de progressão. Claudio et al., (2002) demonstrou que a expressão do Ki-67 foi a maior variável associada a risco de carcinoma, apresentando sensibilidade de 69% com taxa de falso-positivo de 14%.

O marcador MIB-1 vem tendo seu valor prognóstico analisado em outras situações clínicas, como por exemplo, nas biópsias prostáticas pré-operatórias, no tratamento expectante e nos pacientes submetidos à radioterapia. Em relação à biópsia de próstata os resultados encontrados são conflitantes; Ojea Calvo et al. (2004) mostrou que analisando o Ki-67 com índice de corte de 3%, foi menos

efetivos que os fatores prognósticos essenciais em prever a progressão bioquímica. Por sua vez, Zellweger et al.(2009) utilizando um índice de corte de 10%, demonstrou que o ki-67 foi o único fator prognóstico independente para prever recidiva bioquímica quando o escore de Gleason <7 e a percentagem de tecido tumoral na biópsia era baixa.

Em pacientes com achado incidental de câncer de próstata através de ressecção transuretral e com acompanhamento expectante, como analisado por Borre et al(1998b), o índice de proliferação MIB-1 foi o único fator prognóstico independente para sobrevida específica e global, outro estudo realizado em 2009 por Berney et al., demonstrou que o ki-67/MIB-1 estão sendo utilizados amplamente dentro da rotina patológica podendo ajudar na definição por um tratamento expectante ou cirúrgico.

Halvorsen et al. (2003) que demonstrou a correlação significativa do p27 com ki-67, tendo o p27 uma maior fator preditivo em risco de recorrência, aumento do diâmetro tumoral, invasão de vesículas seminais e aumento do estágio patológico. Este maior valor preditivo positivo do p27 também foi descrito por Vis et al.(2000) onde comparando p27, MIB-1 e CD44, apenas o marcador p27 em conjunto com escore de Gleason da biópsia, foram preditores de doença clinicamente significativa após prostatectomia radical. Revelos et al. (2005) mostrou, resultados diferentes, onde baixos níveis de p27 estariam associados a invasão de vesículas seminais, aumento de volume tumoral e alto PSA pré-operatório, porém apenas o envolvimento linfonodal pélvico e MIB-1 seriam fatores prognósticos de falência bioquímica.

Na análise realizada por Pegoretto (2008), onde analisaram os marcadores c-erb-2, E-caderina e MIB-1, o marcador MIB-1 não pode se correlacionar com o PSA, nem com o estágio clínico, porém observou uma forte correlação deste marcador com estágio clínico da peça cirúrgica, bem como observou que o MIB-1 foi o único marcador capaz de prever a recidiva tumoral.

2.5.2 P27

O gene P27Kip1, (*Human Genome Organization - gene symbol* CDKN1B) é um gene situado no cromossoma 12 nos humanos, sendo responsável pela codificação de uma proteína que pertence a *Cip/Kip* família da proteína inibidora da ciclina dependente da kinase. É comumente citada como uma proteína inibidora do

ciclo celular, tendo como função reduzir ou parar o ciclo de divisão celular, sendo peça chave na coordenação da proliferação celular e apoptose (YU *et al.*; 2007). Este gene codifica a proteína que inibe a proliferação celular na fase G1 da mitose. Vários estudos sugerem que o decréscimo de p27 desempenha um papel significativo na progressão do câncer de bexiga e próstata (VIS *et al.*, 2000; CLAUDIO *et al.*, 2002; FREEDLAND *et al.*, 2003), câncer de mama (BARBARESCHI, 1999; TSUCHIYA; ZHANG; KANNO, 1999), pulmão e ovário (CATZAVELOS *et al.*, 1999).

Vários autores descreveram a redução na expressão P27^{Kip1} como fator prognóstico independente e preditor de má evolução, associando a um declínio progressivo deste marcador com a idade, o que poderia explicar a incidência crescente de adenocarcinoma prostático em homens mais idosos (VIS *et al.*; 2000; DOGANAVSARGIL *et al.*, 2006). Zheng *et al.* (2004) descreveram as diferentes expressões da proteína p27 na hiperplasia prostática benigna e no adenocarcinoma, e semelhante a outros autores demonstraram que a perda deste supressor tumoral (p27 negativo ou baixo) tem acurácia preditiva semelhante ao escore de Gleason, estadiamento e PSA (DREHER *et al.*; 2004).

Revelos *et al.* (2005) e Nguyen *et al.* (2009) determinaram em seu estudo com pacientes portadores de adenocarcinoma de próstata submetidos a cirurgia curativa que o p27 e o MIB-1 estiveram correlacionados diretamente com escore de Gleason, extensão extra-capsular, envolvimento de vesículas seminais, metástases em linfonodos pélvicos, margens cirúrgicas positivas, tamanho tumoral e níveis de PSA. Observou-se que o baixo p27 correlacionou-se significativamente com envolvimento de vesículas seminais, aumento do volume tumoral e alto PSA pré-operatório; e que MIB-1 esteve correlacionado com doença metastática em linfonodos pélvicos, sendo um significativo preditor de falência bioquímica.

Roy *et al.* (2008) descreveram que a alteração da proteína p27 com a densidade microvascular e aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), sendo estes marcadores associados ao fenótipo mais agressivo dos cânceres de próstata e com pior prognóstico.

2.5.3 CD34

A proteína CD34 é um membro da família das sialomucinas transmembrânicas que se expressa precocemente nos tecidos hematopoiéticos e vasculares. É também uma importante molécula de adesão, requerida pelas células T para entrada nos linfonodos, expressa como L-selectina que se unem as células T. Células CD 34 positivas são normalmente encontradas no cordão umbilical e medula óssea como células hematopoiéticas, endoteliais progenitoras, endoteliais dos vasos sanguíneos exceto linfáticos, principais e sub-populações de células dendríticas no interstício e nas proximidades dos anexos dérmicos, bem como nos tumores derivados de tecidos moles (DFSP, GIST, PNSTs) (IZAWA; DINNEY, 2001; BONO *et al.*, 2002; CHARLESWORTH; HARRIS, 2006).

A relação entre a expressão da quantidade de microvasos pelo CD34 e seu valor prognóstico para identificar pacientes com alto risco para recorrência é bem descrita em diversos tumores: melanoma, câncer de mama, câncer cervical, estômago, pulmão e câncer de próstata (BETTENCOURT *et al.*, 1998; BONO *et al.*, 2002; KHATAMI, 2005). A densidade micro-vascular (MVD) é considerada um marcador do processo angiogênico, que é responsável pelo crescimento local e pela metástase tumoral. A MVD pode ser avaliada através da imunoreatividade de antígenos de células endoteliais (CD34, CD31, fator VIII) (BONO *et al.*, 2002).

Bligler, Deering e Brawer (1993) e Bettencourt *et al.* (1998) avaliaram as alterações da densidade microvascular nas áreas tumorais e sua correlação com escore de Gleason e grau nuclear e demonstraram diferença da expressão microvascular entre as áreas tumorais e de hiperplasia prostática benigna. Hall *et al.* (1994) descreveram a quantificação da angiogênese tumoral como valor prognóstico negativo em pacientes com adenocarcinoma de próstata localizado. Outros autores demonstraram a MVD como preditor significativo de menor sobrevida livre de doença, bem como a sua utilidade na estratificação dos pacientes após tratamento cirúrgico curativo (BORRE *et al.*, 1998a; HALVORSEN *et al.*, 2000; BUHMEIDA *et al.*, 2006). Entretanto, Rubin *et al.* (1999) e Strohmeyer *et al.* (2000) não observaram a MVD como fator prognóstico útil em homens com doença clinicamente localizada.

Estudos que correlacionaram a superfície vascular tumoral demonstraram sua correlação direta com PSA, tamanho tumoral e recidiva bioquímica, determinando com isso sua utilidade na prática clínica (IZAWA; DINNEY, 2001;

TAVERNA *et al.* 2009). Concato *et al.* (2007) descreveram que a densidade microvascular e Bcl-1 são preditores independentes de mortalidade entre homens com câncer de próstata e tem importância na decisão do tratamento a ser escolhido.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa está de acordo com as normas nacionais e internacionais vigentes (Res. 196/96 CNS-MS e demais resoluções), tendo sido aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC- UFPR) (ANEXO1).

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram estudados 100 casos de pacientes portadores de neoplasia prostática, submetidos à prostato-vesiculectomia radical e linfadenectomia obturatória bilateral, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2006, provenientes de consultório privado (Clínica Urológica de Maringá).

Nesta pesquisa os pacientes apresentavam diagnóstico de adenocarcinoma usual prostático, com estadio clínico pré-operatório entre T1c e T2c. Após a suspeita pela alteração do toque retal ou pelas modificações dos níveis de PSA, procedeu-se a biópsia. Os dados clínicos e o exame físico e laboratorial foram tabulados e acompanhados por um período médio de 16 meses.

As biópsias prostáticas foram realizadas sob sedação por um mesmo profissional, transretal guiadas pelo ultra-som, de maneira sextante com um mínimo de 12 e um máximo de 24 (saturação) fragmentos, nos casos de rebiópsias. Os exames de estadiamento pré-operatório (cintilografia óssea, raios-X de tórax e tomografia computadorizada), foram realizados conforme a necessidade, seguindo as diretrizes da SBU (CORREA et al. 2006) e o estadiamento TNM proposto pela AJCC/UICC em 2002 (GREENE, 2002) (ANEXO 2). Esperou-se de quatro a seis semanas para realização do tratamento cirúrgico.

Os pacientes foram analisados clinicamente, sendo os laudos anátomo patológicos provenientes de um mesmo laboratório (Laboratório Souza) e estes laudos e blocos foram revisados por dois patologistas (patologista geral e uropatologista).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os pacientes foram avaliados em pelo menos duas consultas em separado, e o período de coleta e levantamento de dados duraram oito meses.

3.2.1 Critérios de inclusão

Foram utilizados como critérios de inclusão:

- Idade entre 44 e 75 anos.
- Ausência de tratamento neo-adjuvante prévio ou neoplasia de outro sítio previamente tratada.
- Cirurgia realizada: prostato-vesiculectomia radical retropúbica e linfadenectomia obturatória, conforme descrito por Walsh, com intuito curativo (WALSH, 1998).
- Acompanhamento médio 16 meses.
- Aceitaram a participar das entrevistas e assinaram o consentimento.

3.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após o preparo das peças, os blocos de parafina foram submetidos a cortes de 4 µm de espessura com micrótomo rotativo (*American Optical Instruments®*) e corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE) (ANEXO 3). Os preparados histológicos foram analisados confirmando o padrão acinar usual da neoplasia e analisou-se escore de Gleason primário e secundário.

Para realização da análise imuno-histoquímica foram selecionados as lâminas e blocos com melhor representatividade da neoplasia. Os cortes em parafina foram submetidos à recuperação antigênica em banho-maria em tampão citrato a 10mmol/L em pH 6,0 para posterior processamento imuno- histoquímico (ANEXO 3). O microscópio utilizado para o estudo foi da marca Nikon®, modelo Eclipse E-400. Todas as lâminas foram avaliadas por um mesmo uropatologista.

3.4 COLORAÇÃO IMUNO HISTOQUÍMICA E AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

Do material selecionado na avaliação histológica foram feitas três novas lâminas para imuno-histoquímica com os anticorpos MIB-1, CD34, e P27.

Ki-67 (MIB-1)

Foi utilizado anticorpo clone MIB-1, código M 7240, Dako®, Ca, em diluição 1:250.

Como controle externo positivo foi utilizado fragmento de linfonodo com linfoma, onde as células do centro germinativo coram-se fortemente pelo anticorpo. O epitélio glandular normal da próstata serviu como controle interno negativo. As imagens foram capturadas e as células positivas foram contadas com a utilização de grade e o foi registrado o percentual de células positivas (FIGURA 1).

A leitura da reação foi feita em microscópio óptico e foram observados os critérios para positividade utilizados por outros autores, ou seja, a expressão do antígeno foi considerada positiva quando ao menos 5% das células neoplásicas apresentassem coloração nuclear positiva, por 10 campos de grande aumento (X400) (ANANTHANARAYANAM et al., 2006).

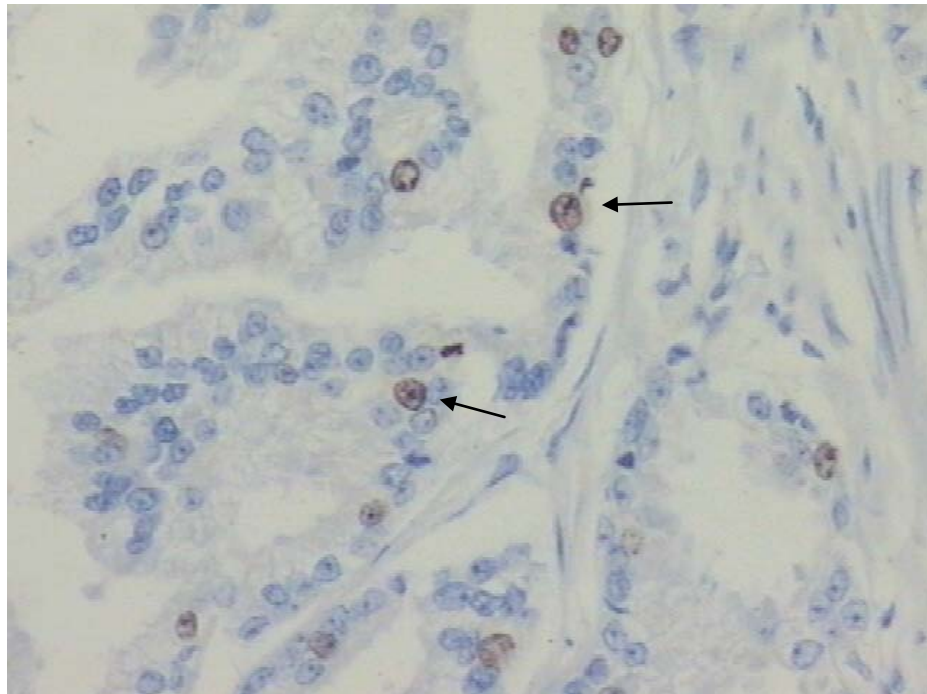


FIGURA 1 - MIB-1 EM ÁCINOS NEOPLÁSICOS (ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA ACINAR USUAL), 200X

P27

Foi utilizado anticorpo p27Kip1, clone SX53G8, Dako®, Ca, em diluição 1:250. Como controle externo positivo foi utilizado tecido prostático normal.

A expressão do antígeno foi considerada positiva quando ao menos 40% das células apresentavam marcação pelo anticorpo (CORDON-CARDO *et al.*, 1998; DROBNJAK *et al.*, 2003) (FIGURA 2).

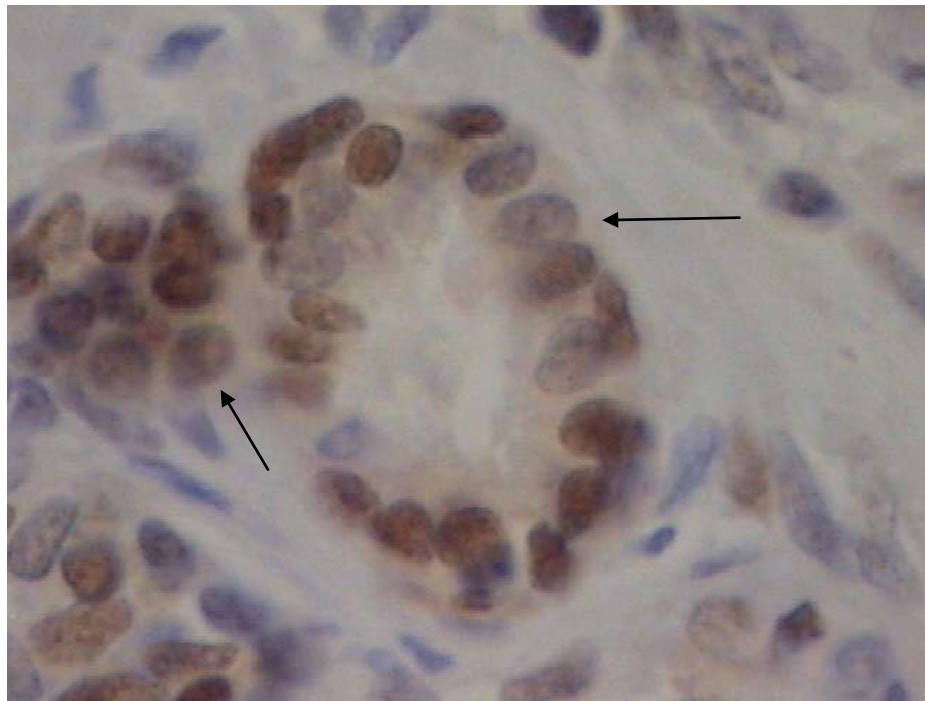


FIGURA 2 - ADENOCARCINOMA COM NÚCLEOS MARCADOS PELO ANTICORPO P27 – 100X/600X

CD34

Foi utilizado anticorpo CD34 classe II, clone QBEnd-10, código M7165, Dako®, Ca, em diluição 1:250.

Para garantir a veracidade da coloração foram realizados controles. Como controle externo positivo foi utilizado tecido amigdaliano.

Foram contadas as células positivas em 10 campos de grande aumento (x400 - Olympus® BH2 microscope) (ARAKAWA *et al.*, 1997; TAILLE *et al.*, 2000; BONO *et al.*, 2002) (FIGURA 3).

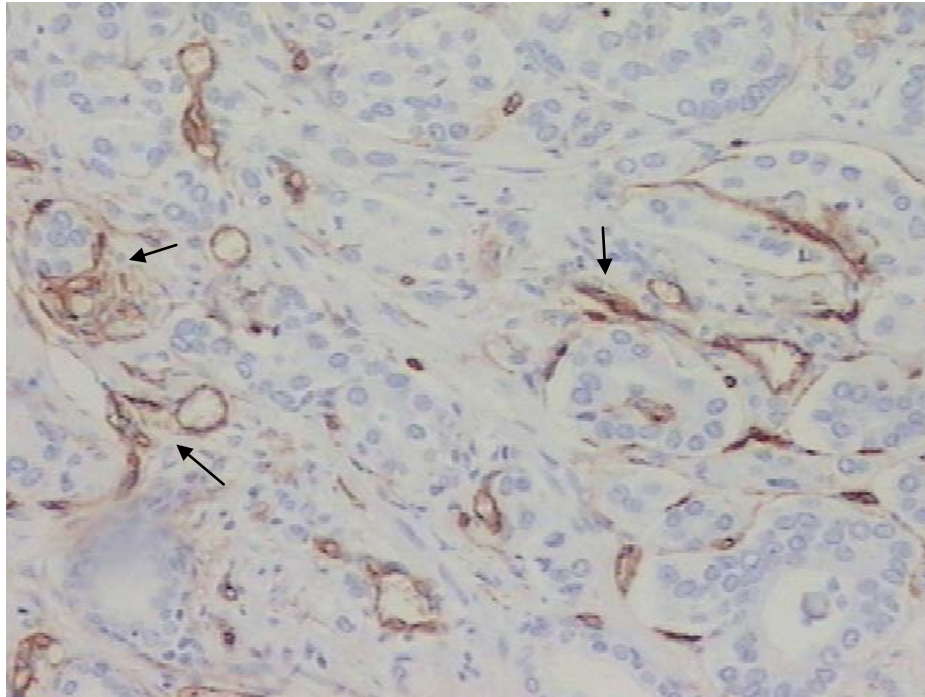


FIGURA 3 - CÉLULAS ENDOTELIAIS MARCADAS PELO ANTICORPO CD34
- 100X

3.5 SEGUIMENTO DOS PACIENTES

Em nosso estudo, os prontuários foram analisados retrospectivamente, e na sua maioria o seguimento destes pacientes foi quadrimestral nos primeiros dois anos e semestralmente após até o 5º ano. Nas consultas programadas foram avaliadas as modificações: na história clínica (disfunção erétil e disfunção miccional), no exame físico geral e urológico (toque retal) e nos exames laboratoriais. Avaliação radiológica, cintilográfica ou tomográfica foram realizadas quando se detectou recidiva bioquímica ou progressão tumoral mensurável.

Utilizou-se como critério de recidiva a elevação do antígeno prostático específico (PSA) para nível maior ou igual a 0,2 ng/ml.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Procedeu-se a análise descritiva dos dados através de tabelas, quadros e

gráficos. Utilizou-se nesta pesquisa os testes paramétricos “t de Student” e os não-paramétricos “Mann-Whitney”, “Comparação entre duas Proporções” (através do software “*Primer of Biostatistics*”), “Qui-Quadrado” e “Exato de Fisher” (pelo Epi-Info). O nível de significância (probabilidade de significância) adotado foi menor que 5% ($p < 0,05$) (STATON, 1997).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DEMOGRÁFICA

Foram avaliados 100 pacientes com câncer de próstata, com idade média de $63,7 \pm 6,8$ anos, variando de 44,0 a 75,0 anos; e com maior concentração para a faixa etária de 60 a 69 anos (58,0%) (QUADRO 1).

QUADRO 1 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA AVALIAÇÃO DEMOGRÁFICA DOS PACIENTES ESTUDADOS						
VARIÁVEIS	Nº	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA
IDADE (anos)	100	63,7	6,8	44,0	75,0	-
TEMPO DE SEGUIMENTO (meses)	100	36,7	18,8	16,7	108,7	33,6
PSA (ng/dl)	100	7,8	4,5	2,3	24,0	6,5
PRÓSTATA (Peso Médio) (g)	86	43,2	14,7	21,3	90,1	41,7
ESCORE DE GLEASON	100	6,3	0,5	5,0	8,0	-

NOTA: Desvio padrão muito elevado, recomenda-se utilizar a mediana.

O PSA desses pacientes foi de $7,8 \pm 4,5$ ng/dl (mediana de 6,5) variando de 2,3 a 24,0 ng/dl, sendo que a maioria dos pacientes (70,0%) o PSA variou de 4,0 a 9,9 ng/dl (GRÁFICO 1).

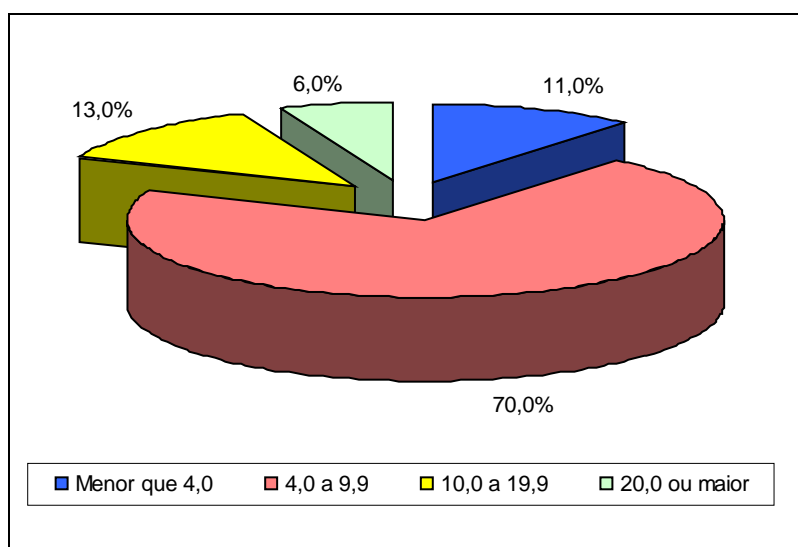


GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES POR GRUPO DE PSA

FONTE: Apêndice 3

Foi observado maior proporção de escore de Gleason até 6 (72,0%); e estágio patológico predominante foi pT2c (65,0%) (APÊNDICE 3).

Neste estudo o seguimento dos pacientes variou de 16,7 a 108 meses, com média de $36,7 \pm 18,8$ meses.

4.2 EXPRESSÃO DOS MARCADORES

4.2.1 Marcador MIB-1

No marcador MIB-1 observa-se maior proporção de expressão negativa (63,0%) ($p < 0,0001$) (GRÁFICO 2).

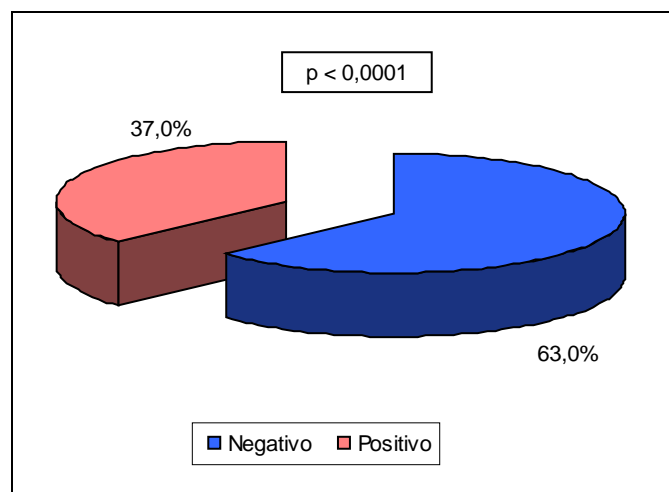


GRÁFICO 2 - EXPRESSÃO DO MARCADOR MIB-1

FONTE: Apêndice 1

4.2.2 Marcador P27

No marcador P27 observa-se maior proporção de expressão positiva (60,0%) ($p=0,007$) (GRÁFICO 3).

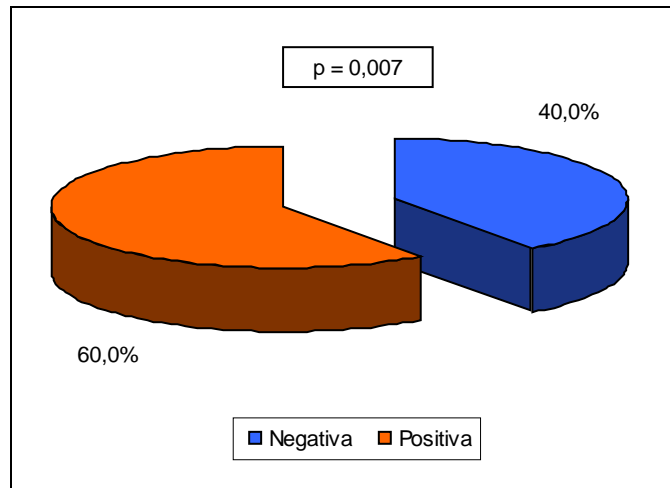


GRÁFICO 3 – EXPRESSÃO DO MARCADOR P27

FONTE: Apêndice 2

4.2.3 Marcador CD34

No marcador CD34 observa-se uma correlação regular ($r=0,1936$; $p=0,054$) indicando que quanto maior a área tumoral, maior a expressão do marcador CD34 (GRÁFICO 4).

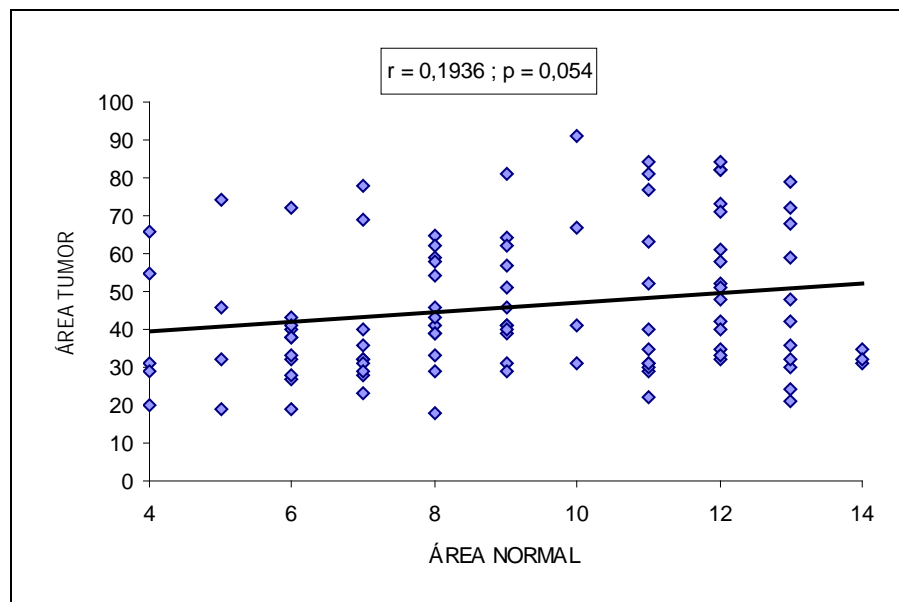


GRÁFICO 4 – CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DO MARCADOR CD34 NORMAL E TUMOR

FONTE: Dados Brutos

4.3.2 Marcador P27

Na avaliação do Marcador P27 foi observado diferença significativa apenas no Escore de Gleason. Os pacientes com expressão positiva (P27 Positivo) apresentaram maior proporção em relação ao escore de Gleason igual ou inferior a 6 ($p=0,015$) (APÊNDICE 5).

O QUADRO 3 demonstra a correlação do p27 com as demais variáveis.

QUADRO 3 - CORRELAÇÃO DOS DADOS EM RELAÇÃO AO MARCADOR P27			
DADOS	CORRELAÇÃO (r)	VALOR DE p	SIGNIFICÂNCIA
ESTADIO PATOLÓGICO	+ 0,1367	0,175	NS
ESCORE DE GLEASON			
1. Valor 1	- 0,2027	0,043	S
2. Valor 2	- 0,2239	0,025	S
3. Total	- 0,3000	0,002	S
TEMPO DE SEGUIMENTO (meses)	- 0,0235	0,816	NS
PSA (ng/dl)	- 0,1351	0,180	NS
EVOLUÇÃO DO PSA (Cura / Recidiva)	- 0,0745	0,462	NS
NOTA: Análise de Correlação.			

Na comparação das variáveis do marcador P27, foi observado que os pacientes com expressão negativa também apresentaram: PSA médio mais alto ($p=0,091$) (probabilidade limítrofe indicando tendência); escore de Gleason mais alto ($p<0,0001$); e maior expressão do marcador CD34 na área de tumoral ($p=0,036$) (QUADRO 4).

QUADRO 4 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS DADOS EM RELAÇÃO AO MARCADOR P27							
VARIÁVEIS	Nº	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA	VALOR DE p ⁽¹⁾
PSA (ng/dl)	100	7,8	4,5	2,3	24,0	6,5	0,091
1. Negativo	40	8,6	4,8	2,3	23,5	7,7	
2. Positivo	60	7,3	4,2	2,3	24,0	6,2	
ESCORE DE GLEASON	100	6,3	0,5	5,0	8,0	-	<0,0001 ⁽²⁾
3. Negativo	40	6,5	0,6	6,0	8,0	-	
4. Positivo	60	6,2	0,4	5,0	7,0	-	
TEMPO DE SEGUIMENTO (meses)	100	36,7	18,8	16,7	108,7	33,6	0,933
5. Negativo	40	37,3	19,7	16,7	106,6	33,9	
6. Positivo	60	36,4	18,2	18,2	108,7	33,4	
CD34 (ÁREA) - NORMAL	100	9,3	2,8	4,0	14,0	9,0	0,124
7. Negativo	40	9,8	2,7	4,0	14,0	10,5	
8. Positivo	60	8,9	2,8	4,0	14,0	9,0	
CD34 (ÁREA) - TUMOR	100	46,1	18,5	18,0	91,0	40,5	0,036
9. Negativo	40	51,2	19,1	18,0	84,0	47,0	
10. Positivo	60	42,7	17,4	19,0	91,0	39,0	
CD34 - TUMOR / NORMAL (Proporção)	100	5,4	2,7	1,6	16,5	4,9	0,431
11. Negativo	40	5,5	2,6	2,3	16,5	5,3	
12. Positivo	60	5,3	2,7	1,6	14,8	4,6	
NOTA: Desvio padrão muito elevado, recomenda-se utilizar a mediana.							
(1) Mann-Whitnev; (2) t de Student.							

4.3.3 CD34

Correlacionou-se o marcador CD34 na área tumoral e observou-se que quanto menor o CD34 menores são os valores: do PSA ($p < 0,0001$) (GRÁFICO 5); do escore de Gleason ($r = 0,5726$; $p < 0,0001$) (GRÁFICO 6). Quanto maior o CD34 maior é o estadiamento ($r = 0,3305$; $p < 0,0001$) e a chance de recidiva ($p = 0,002$) (QUADRO 5).

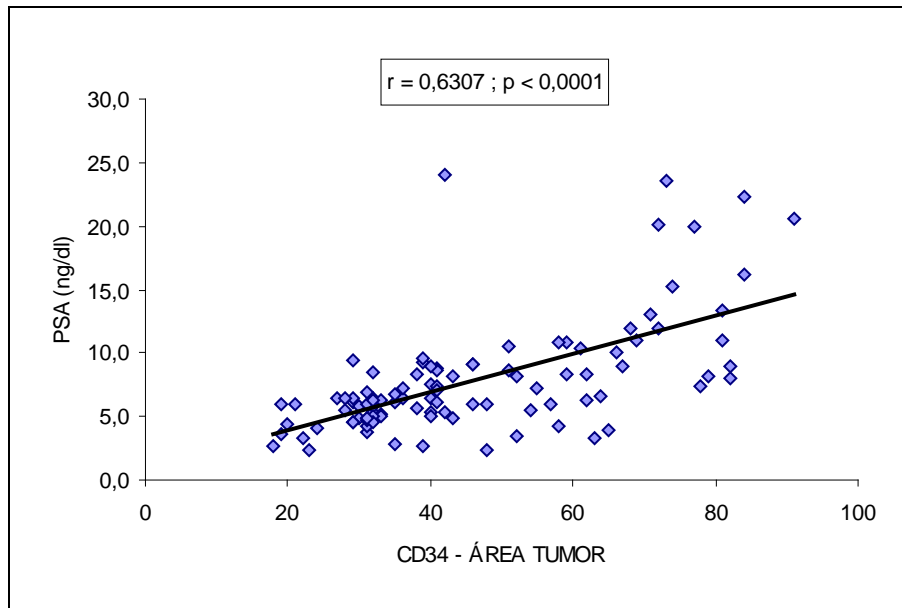


GRÁFICO 5 - CORRELAÇÃO ENTRE O PSA E O MARCADOR CD34
ÁREA TUMOR

FONTE: Apêndice 7

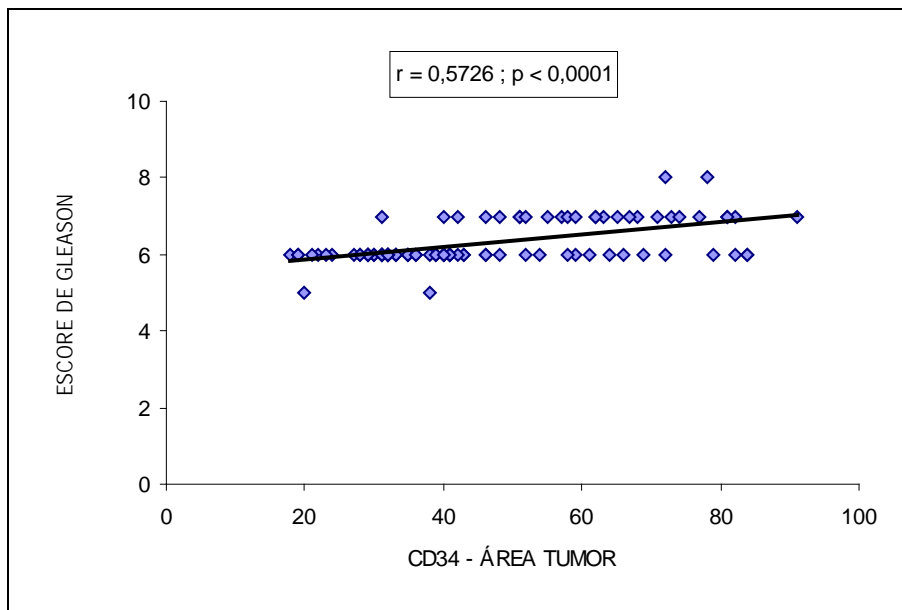


GRÁFICO 6 - CORRELAÇÃO ENTRE O ESCORE DE GLEASON E O
MARCADOR CD34 ÁREA TUMOR

FONTE: Apêndice 7

QUADRO 5 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA EVOLUÇÃO DO PSA, ESTADIAMENTO PATOLÓGICO E DO MARCADOR P27 EM RELAÇÃO O MARCADOR CD34 - ÁREA TUMOR							
CD34 - ÁREA TUMOR	Nº	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA	VALOR DE p ⁽¹⁾
PSA (ng/dl)							0,002
Cura	74	42,1	15,8	18,0	84,0	39,0	
Recidiva	26	57,2	21,2	19,0	91,0	62,0	
ESTADIAMENTO							<0,0001 ⁽²⁾
1a	08	31,9	8,6	21,0	46,0	-	
2a	18	32,5	8,8	19,0	58,0	-	
2b	04	45,8	12,0	30,0	59,0	-	
2c	65	50,7	19,1	18,0	91,0	-	
3a / 3b	05	57,6	17,5	38,0	84,0	-	
3a	01	38,0	-	-	-	-	
3b	04	62,5	15,8	48,0	84,0	-	
MARCADOR P27							0,036
Negativo	40	51,2	19,1	18,0	84,0	47,0	
Positivo	60	42,7	17,4	19,0	91,0	39,0	
NOTA: Desvio padrão muito elevado, recomenda-se utilizar a mediana.							
(1) Mann-Whitney; (2) Análise de Variância (ANOVA One Way).							

4.4 EVOLUÇÃO DO PSA (PSA - CONTROLE OU RECIDIVA)

Na avaliação da evolução do PSA (PSA Controle) foi observado que os pacientes com recidiva apresentam maior proporção PSA igual ou maior a 10 ng/dl ($p=0,023$) (QUADRO 6 – APÊNDICE 6).

Na comparação entre os grupos de PSA (Cura x Recidiva) foram observadas as seguintes diferenças significativas para o Grupo de pacientes com recidiva: são mais novos, em média 2,1 anos ($p=0,024$); pertencem ao grupo de PSA mais elevado ($p=0,002$); com escore de Gleason mais alto ($p=0,006$); e com maior tempo de *seguimento* ($p=0,025$) (QUADRO 6).

Foram observadas alterações significativas quando observadas: maior expressão do marcador CD34 na área tumoral ($p=0,002$); maior proporção de expressão do CD34 na área tumoral, comparada à área normal ($p=0,001$), e marcador MIB-1 positivo ($p=0,0002$) (QUADRO 6).

5 DISCUSSÃO

Os dados demográficos e epidemiológicos encontrados neste estudo foram semelhantes aos das grandes séries da literatura (PARTIN *et al.*, 2001; MAKAROV *et al.*, 2007; PEGORETTO, 2008).

5.1 EXPRESSÃO DE MIB-1

A expressão positiva do MIB-1 neste estudo foi de 37% em relação ao número global dos pacientes, dado que equivale aos encontrados por Pegoretto (2008) onde a análise da positividade foi de 40%.

Na literatura, várias séries com grande casuística de pacientes com adenocarcinoma submetidos à prostatectomia radical, demonstraram correlação significativa entre o marcador MIB-1 com: grau nuclear, escore de Gleason e estágio patológico (BETTENCOURT *et al.*, 1996; BUBENDORF *et al.*, 1996; AALTOMAA *et al.*, 1997; STATTIN *et al.*, 1997). Estes dados equivalem aos encontrados nesta pesquisa, em que se observou correlação significativa deste marcador com escore de Gleason na peça cirúrgica ($p < 0,0001$) e estágio patológico mais elevado ($p < 0,0001$). Estes autores descreveram que o MIB-1 em conjunto com o PSA e estágio patológico associaram-se com probabilidade de progressão mais precoce. Além destes estudos, pesquisas recentes demonstraram que o marcador MIB-1 associa-se a uma maior chance de recidiva e a uma menor taxa de sobrevida livre de doença, dados que coincidem com os apresentados nesta pesquisa, em que o marcador MIB-1 associou-se com uma maior chance de recidiva bioquímica ($p = 0,0002$) (SEBO *et al.*, 2002; TAFTACHI *et al.*, 2005).

Observou-se neste grupo de pacientes avaliados que o PSA foi um importante fator preditor de recidiva, e esteve associado ao marcador MIB-1 ($p = 0,010$), o que equivale aos resultados descritos por Berney *et al.* (2009). Embora no estudo realizado por Khatami *et al.* (2009), o MIB-1 e o PSA fossem descritos como fatores preditores de progressão da doença, este autor não observou correlação entre eles. Da mesma forma, a análise realizada por Pegoretto (2008) não observou a associação deste marcador com o PSA, porém em concordância com os dados encontrados neste estudo, observou uma forte correlação deste marcador com

estádio clínico da peça cirúrgica, bem como observou que o MIB-1 foi o único marcador capaz de prever a recidiva tumoral.

De forma contrária aos achados descritos nesta análise, os estudos de Coetzee *et al.* (1997) e Vis *et al.* (2000) utilizando índices de corte diferentes aos empregados em nosso estudo, não conseguiram correlacionar este índice de proliferação com nenhum dos fatores essenciais, nem como fator de agressividade tumoral ou fator prognóstico independente. Nariculam *et al.* (2009) que analisaram os marcadores Ki-67, p53 e BCL-2, também não observaram diferenças significativas na expressão destes marcadores com os grupos com recidiva precoce e recidiva bioquímica.

A perspectiva de utilização deste marcador em biópsias prostáticas, em pacientes com achado incidental após ressecção endoscópica de próstata e nos pacientes submetidos à radioterapia é controversa, dado a grande divergência dos resultados publicados (BORRE *et al.*, 1998b; OJEA CALVO *et al.*, 2004; ZELLWEGER *et al.*, 2009) .

Diversas pesquisas descrevem a correlação significativa dos marcadores MIB-1 e p27, porém demonstraram que em associação com os fatores essenciais, apenas o p27 comportou-se como fator preditivo para recidiva bioquímica (VIS *et al.*, 2000; HALVORSEN; HAUKAAS; AKSLEN, 2003). Estes dados são diferentes aos achados deste estudo, em que não foi encontrada correlação entre estes marcadores ($p=0,899$). O marcador p27, também não foi útil como instrumento preditor de falência bioquímica. De forma semelhante aos dados desta pesquisa, Revelos *et al.* (2005) mostraram que destes marcadores apenas o MIB-1 correlacionou-se a chance de falência bioquímica.

A análise do MIB-1 com a angiogênese, foi descrita por Moul *et al.* (1999), que não conseguiram correlacionar, talvez pela falta de padronização, o marcador MIB-1 e o CD34 como fatores prognósticos independentes. Neste estudo, observou-se uma correlação direta e estatisticamente significativa entre a expressão do MIB1 e a maior expressão do CD34 na área tumoral ($p=0,012$), que pode ser explicada uma vez que se analisarmos que o MIB-1 determina índice de proliferação e para que tal ocorra, faz-se necessário maior vascularização para trazer mais nutrientes e oxigênio.

O índice de proliferação calculado pelo MIB-1 pode ser utilizado em associação com PSA, Gleason e estadiamento tumoral para aumentar a acurácia da

avaliação clínica pré tratamento no que diz respeito à evolução da doença, como identificado em nosso estudo, porém não substitui os fatores essenciais.

5.2 EXPRESSÃO DE P27

Neste trabalho encontrou-se uma maior expressão positiva do p27 (60%), semelhante aos dados descritos na literatura (FREEDLAND *et al.*, 2003).

A expressão negativa do p27 está associada: maior escore de Gleason, estágio patológico mais avançado, e inversamente com os níveis de PSA (DREHER *et al.*, 2004; ZHENG *et al.*, 2004; REVELOS *et al.*, 2005; NGUYEN *et al.*, 2009). Estes achados são coincidentes com os deste estudo onde houve associação do marcador p27 com o escore de Gleason ($p=0,015$) e com os níveis de PSA ($P=0,091$), porém não foi observado correlação com o estágio patológico ($p=0,506$). Resultados diferentes foram obtidos por Ribal *et al.* (2003) que não encontraram correlação do p27 com: estágio patológico, escore de Gleason, níveis de PSA ou margens cirúrgicas.

Vários autores demonstraram a importância do p27 e seu papel como fator prognóstico independente para recidiva bioquímica e progressão da doença, isto é a associação do p27 negativo a estádios patológicos mais avançados (YANG *et al.*, 1998), com uma maior agressividade biológica (CORDON-CARDO *et al.* 1998, VIS *et al.*, 2000; REVELOS *et al.*, 2005), à doença micro-metastática (FREEDLAND *et al.*, 2003) com proliferação celular e apoptose e portanto, pior prognóstico (DOGANAVSARGIL *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2007). Estes resultados diferem aos encontrados nesta pesquisa, onde não se observou associação do marcador p27 com recidiva bioquímica ($p=0,609$).

Roy *et al.* (2009) analisaram a relação entre a baixa expressão do p27 com a maior densidade microvascular e o aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), determinando com isso um fenótipo mais agressivo aos cânceres de próstata. Estes achados coincidem com os desta pesquisa onde se encontrou a correlação inversa entre o marcador p27 e o CD34 na área tumoral ($p=0,036$).

Também, o p27 negativo mesmo se correlacionado aos valores de PSA e escore de Gleason, não teve a mesma eficácia em definir a recidiva bioquímica quando comparado aos marcadores MIB-1 e CD34. Diferentemente do que se pode

observar na literatura (VIS *et al.*, 2000; REVELOS *et al.*, 2005), o p27 negativo não se apresentou como fator de pior prognóstico, ou fator prognóstico independente para prever recidiva clínica ou sobrevida livre de doença.

5.3 EXPRESSÃO DE CD34 / DENSIDADE MICROVASCULAR

A técnica imuno-histoquímica utilizada para aferir a densidade microvascular (MVD), utiliza os anticorpos CD31, CD34 ou o anticorpo contra o fator VIII; sendo que dentre estes o CD34 mostra-se como melhor preditor para recidiva bioquímica, mostrando uma melhor correlação ao grau tumoral, estágio e evolução do PSA (RUBIN *et al.* 1999, TAILLE *et al.*, 2000, TROJAN *et al.*, 2004, PANG; POON, 2006). Após análise destes resultados optou-se pela utilização do anticorpo CD34 para analisar a densidade microvascular.

Existe uma grande inconsistência dos resultados de diferentes investigadores, decorrente das variações na metodologia da medida da densidade microvascular (índices de corte), nesta pesquisa decidiu-se pela contagem padronizada, defendida por muitos autores, das células marcadas em 10 campos de grande aumento (IZAWA; DINNEY, 2001; BUHMEIDA *et al.*, 2006; CHARLESWORTH; HARRIS, 2006).

Em concordância com várias séries de literatura que demonstram a correlação da densidade microvascular e sua correlação direta com escore de Gleason, estágio tumoral, progressão, metástase e sobrevida (BETTENCOURT *et al.* 1998; BORRE *et al.*, 1998a; BORRE *et al.*, 1998c; BONO *et al.* 2002, REVELOS *et al.* 2007), observou-se neste estudo uma correlação direta da expressão do marcador CD34 na área tumoral com: escore de Gleason ($p < 0,0001$), estadiamento patológico ($p < 0,0001$) e chance de recidiva ($p = 0,002$).

Em 2006, Charlesworth e Harris descreveram que o PSA não deveria ter correlação com a angiogênese, em decorrência da habilidade do PSA em converter plasminogênio em fragmentos semelhantes à angiostatina, produzindo uma menor vascularização e contribuindo para o crescimento lento dos tumores prostáticos. De maneira oposta, Halvorsen *et al.* (2000), analisando uma grande série de pacientes submetidos à cirurgia e Hall *et al.* (1994) analisando pacientes submetidos à radioterapia, concluíram que nos cânceres de próstata moderadamente diferenciados a densidade microvascular pode melhorar a estratificação prognóstica

destes pacientes bem como está correlacionada ao PSA pré-operatório. Em nosso estudo, observamos também a correlação estatisticamente significativa do marcador CD34 com PSA ($p < 0,0001$), bem como estes dois marcadores mostraram-se preditores de recidiva bioquímica ($p = 0,002$).

Os resultados da literatura são conflitantes e demonstram que a avaliação da densidade microvascular, ainda que esteja associada aos fatores prognósticos essenciais, não se comportam como fatores prognósticos independentes, nem são melhores do que eles em predizer a evolução (ARAKAWA *et al.*, 1997) e não tem um valor prognóstico melhor do que outros marcadores imuno-histoquímicos como p53 e bcl-2 (GETTMANN *et al.*, 1999; KRUPSKI *et al.*, 2000).

6 CONCLUSÃO

1- A análise imuno-histoquímica demonstrou significância para o MIB-1 ($p < 0,0001$) e p27 ($p = 0,007$), com maior proporção de expressão negativa e positiva respectivamente. A análise imuno-histoquímica demonstrou que a expressão do marcador CD34 apresentou correlação regular e significativa com área tumoral ($p = 0,05$).

2- A análise de correlação da expressão dos marcadores com os fatores prognósticos essenciais demonstrou que:

A- O PSA mais elevado teve correlação significativa com: MIB-1 positivo ($p = 0,031$), tendência para o p27 negativo ($p = 0,091$) e com a maior expressão do marcador CD34 na área tumoral ($p < 0,0001$).

B- Para o escore de Gleason da peça cirúrgica mais elevado ≥ 7 demonstrou-se associação significativa com: MIB-1 positivo ($p = 0,0003$), p27 negativo ($p < 0,0001$) e com a maior expressão do CD34 na área tumoral ($p < 0,0001$).

C- A análise do estadio patológico mais elevado correlacionou-se com: MIB-1 positivo ($p = 0,001$) e com a maior expressão do marcador CD34 na área tumoral ($p < 0,0001$).

3- A recidiva tumoral esteve diretamente correlacionada com $PSA \geq 10$ ng/ml ($p = 0,002$), com maior escore Gleason ($p = 0,006$); com maior expressão positiva do MIB-1 ($p = 0,0002$), e maior expressão do marcador CD34 na área tumoral ($p = 0,002$).

.

REFERÊNCIAS

- AALTOMAA, S. *et al.* Value of Ki-67 immunolabelling as a prognostic factor in prostate cancer. **Eur. Urol.**, Basel, v.3, p.2410-2415, 1997.
- ANANTHANARAYANAN, V. *et al.* Alterations of proliferation and apoptotic markers in normal and premalignant tissue associated with prostate cancer. **BMC Cancer**, London, v.73, n.6, p.1-9, 2006.
- ANNICOTTE, J.S. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor regulates e-cadherin expression and inhibits growth and invasion of prostate cancer. **Mol. Cell. Biol.**, Bethesda, v.26, p.7561-7574, 2006.
- AMERICAN CANCER SOCIETY, 2006. **Cancer facts and figures 2006**. Atlanta, 2006.
- ARAKAWA, A. *et al.* Prognostic significance of angiogenesis in clinically localized prostate cancer (staining for factor VIII-related antigen and CD34 antigen). **Prost. Cancer Prog. Dis.**, London, v.1, p.32-38, 1997.
- ARAP, M.A. **Estudo da proteína de choque térmico GRP78 para o desenvolvimento de um sistema de receptor ligante para o câncer de próstata**. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- ARLEN, P.M. *et al.* Prostate specif antigen working group guidelines on prostate specif antigen doubling time. **J. Urol.**, Baltimore, v.179, p.2181-2186, 2008.
- BANERJEE, A.G. *et al.* Expression of biomarkers modulating prostate cancer angiogenesis: differential expression of annexin II in prostate carcinomas from India and USA. **Mol. Cancer**, London, v.2, p.1-13, 2003.
- BARBARESCHI M. P27 Expression, a cyclin dependent kinase inhibitor in breast carcinoma. **Adv. Clin. Pathol.**, New York, v.3, p.119-127, 1999.
- BARGMANN, C.I.; HUNG, M-C.; WEINBERG, R.A. Multiple independent activations of the new oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. **Cell**, Cambridge, v.45, p.649-657, 1986.
- BEE, A. *et al.* Ribosomal protein L19 is a prognostic marker for human prostate cancer. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v.12, n.7, p.2061-2065, 2006.
- BERNEY, D.M. *et al.* Ki-67 and outcome in clinically localized prostate cancer: analysis of conservatively treated prostate cancer patients from the Trans-Atlantic Prostate Group Study. **Br. J. Cancer**, London, v.100, n.6, p.888-893, 2009.

BETTENCOURT, M.C. *et al.* Ki-67 expression is a prognostic marker of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. **J. Urol.**, Baltimore, v.156, p.1064-1068, 1996.

BETTENCOURT, M.C. *et al.* CD34 immunohistochemical assessment of angiogenesis as a prognostic marker for prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. **J. Urol.**, Baltimore, 160:459-465. 1998

BLIGLER, S.A.; DEERING, R.E.; BRAWER, M.K. Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostatic tissue. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v.24, p.220, 1993.

BILLIS, A. *et al.* The impact of the 2005 international society of urological pathology consensus conference on standard Gleason grading of prostatic carcinoma in needle biopsies. **J.Urol.**, Baltimore, v.180, p. 548-553, 2008.

BONO, A.V. *et al.* Microvessel density in prostate carcinoma. **Prost. Cancer Prost. Dis.**, London, v. 5, p.123-127, 2002.

BORRE, M. *et al.* Tumor cell proliferation and survival in patients with prostate cancer followed expectantly. **J. Urol.**, Baltimore, v.159, p.1609-1614, 1998a.

BORRE, M. *et al.* Immunohistochemical Bcl-2 and Ki-67 expression predict survival in prostate cancer patients followed expectantly. **Prost. Cancer Prost. Dis.**, London, v.5, p.268-275, 1998b.

BORRE, M. *et al.* Density predicts survival in prostate cancer patients subjected to watchful waiting. **Br. J. Cancer**, London, v.78, p.940-944, 1998c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2008. **Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2008.

BREWSTER, S. F. *et al.* Preoperative p53, bcl-2, CD44 and E-cadherin immunohistochemistry as predictors of biochemical relapse after radical prostatectomy. **J. Urol.**, Baltimore, v.161, p.1238-1243, 1999.

BUBENDORF, L. *et al.* Ki-67 labeling index: an independent predictor of progression in prostate cancer treated by radical prostatectomy. **J. Pathol.**, Edinburgh, v.178, p.437-441, 1996.

BUHMEIDA, A. *et al.* Prognostic factors in prostate cancer. **Diag. Pathol.**, London, v.1,p.1-15, 2006.

CARTER, B.S. *et al.* Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. **J. Urol.**, Baltimore, v.150, p.797-802, 1993.

CATTORETTI, G. *et al.* Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave- processed formalin- fixed paraffin sections. **J. Pathol.**, Edinburgh, v.168, p.357-363, 1992.

CATZAVELOS, C. *et al.* Reduced expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in non-small cell lung carcinoma: a prognostic factor independent of Ras. **Cancer Res.**, Baltimore, v.59, p.684-688, 1999.

CHARLESWORTH, P.J.S.; HARRIS, A.L. Mechanism of disease: angiogenesis in urologic malignancies. **Nat. Clin. Pract. Urol.**, London, v.3, n.3, p.157-169, 2006.

CLAUDIO, P.P. *et al.* Expression of cell-cycle-regulated proteins pRb2/p130, p107, p27kip1, p53, mdm-2 and Ki-67 (MIB-1) in prostatic gland adenocarcinoma. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v.8, p.1808-1815, 2002.

COETZEE, L.J. *et al.* Proliferative index determination in prostatic carcinoma tissue: is there any additional prognostic value greater than that of Gleason score, ploidy and pathological stage? **J. Urol.**, Baltimore, v.157, p.214-218, 1997.

CONCATO, J. *et al.* Molecular markers and mortality in prostate cancer. **BJU Int.**, London, v.100, p.1259-1263, 2007.

CORDON-CARDO, C. *et al.* Distinct altered pattern of p27kip1 gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. **J.Natl. Can. Inst.**, Bethesda, v.90, p.1285-1291, 1998.

COOKSON, M.S. *et al.* Variation in the definition of biochemical recurrence in patients treated for localized prostate cancer: The American Urological Association Prostate Guidelines for Localized Prostate Cancer Update Panel Report and Recommendations for a Standard in the Reporting of Surgical Outcomes. **J. Urol.**, Baltimore, v.177, p.540-545, 2007.

COOPER, L.S. *et al.* Cell proliferation measured by MIB1 and timing of surgery for breast cancer. **Br. J. Cancer**, London, v.77, p.1502-1507, 1998.

CORREA, L.A. *et al.* **Câncer de próstata: fatores prognósticos.** Projeto Diretrizes. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Urologia, 2006. p.1-11.

D'AMICO, A.V. *et al.* Identifying men diagnosed with clinically localized prostate cancer who are at high risk for death from prostate cancer. **J. Urol.**, Baltimore, v.176 n.6 Pt 2, p.11-15, 2006.

DHAM, P. *et al.* A critical review of clinical practice guidelines for the management of clinically localized prostate cancer. **J. Urol**, Baltimore, v.180, p.451-460, 2008.

DE MARZO, A.M. *et al.* Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: Implications for prostatic carcinogenesis. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v.155, p.1985- 1992, 1999a.

DE MARZO, A.M. *et al.* E-cadherin expression as a marker of tumor aggressiveness in routinely processed radical prostatectomy specimens. **Urology**, Ridgewood, v.53, p.707, 1999b.

DREHER, T. *et al.* Reduction of PTEN and p27kip1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. Analysis in radical prostatectomy specimens and needle biopsies. **Virchows Arch.**, Berlin, v.444, n.6, p.509-517, 2004.

DHIR, R. Prostate cancer biobanking. **Curr. Opin. Urol.**, London, v.18, p.309-314, 2008.

DOGANAVSARGIL, B. *et al.* A comparison of p21 and p27 immunoexpression in benign glands, prostatic intraepithelial neoplasia and prostate adenocarcinoma. **BJU Int. Urol.**, London, v.97, p.644-648, 2006.

DROBNJAK, M. *et al.* Altered expression of p27 and skp2 proteins in prostate cancer of African-american patients. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v.9, p.2612-2619, 2003.

ELLIOT, C.S. ; SHINGHAL, R. ; PRESTI JR, J.C. Racial variations in the performance of prostate specific antigen and prostate specific antigen density in the era of extended prostate biopsy schemes. **J. Urol.**, Baltimore, v.180, p.1318-1324, 2008.

ELLING, T.E. *et al.* NSAID activated gene (NAG-1), a modulator of tumorigenesis. **J. Bioch. Mol. Biol.**, New York, v.39, n.6, p.649-655, 2006.

EPSTEIN, J.I.; CARMICHAEL, M.J.; PARTIN, A.W. Small high grade adenocarcinomas of the prostate in radical prostatectomy specimens performed for non-palpable disease: pathogenic and clinical implications. **J.Urol.**, Baltimore, v.151, p.1587–1592, 1994.

ERCOLE, B. *et al.* Outcome following active surveillance of men with localized prostate cancer diagnosed in the prostate specific antigen era. **J. Urol.**, Baltimore, v.180,p.1336-1341, 2008.

FENELEY, M.R. *et al.* Ki-67 in early prostate cancer and associated pathological lesions. **J. Clin. Pathol.**, Edinburgh, v.49, p.741-748, 1996.

FERGUSON, J. *et al.* Prostate-specific antigen detected prostate cancer: Pathological characteristics of ultrasound visible versus ultrasound invisible tumors. **Eur. Urol.**, Basel, v.27, p.8, 1995.

FOSSA, A. *et al.* Independent prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in pN0 prostate cancer undergoing curative radiotherapy. **Int. J. Cancer**, New York, v.99, p.100-105, 2002

FREEDLAND, S.J. *et al.* Preoperative p27 status is an independent predictor of prostate specific antigen failure following radical prostatectomy. **J. Urol.**, Baltimore, v.169, p.1325-1220, 2003.

FREEDLAND, S.J. *et al.* Risk of prostate cancer–specific mortality following biochemical recurrence after radical prostatectomy. **JAMA**, Chicago, v.294, p.433–439, 2005.

FREEDLAND, S.J.; KRUPSKI, T.L.; MOUL, J.W. Update on outcomes research databases in prostate cancer 2006. **Curr. Opin. Urol.**, London, v.16, p.168-172, 2006.

FREEDLAND, S.J.; MOUL, J.W. Prostate specif antigen recurrence after definitive therapy. **J. Urol.**, Baltimore, v.177, p.1985-1991, 2007.

GERDES, J. *et al.* Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v.138, p.867-873, 1991.

GETTMAN, M.T. *et al.* Role of microvessel density in predicting recurrence in pathologic Stage T3 prostatic adenocarcinoma. **Urology**, Ridgewood, v.54, p.479-485, 1999.

GLEASON, D. F. *et al.* Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histologic grading and clinical staging. **J. Urol.**, Baltimore, v.111, p.58–64, 1974.

GLOVER, F.E. *et al.* Family study of prostate cancer in Jamaica. **Urology**, Ridgewood, v.52, p.441-443, 1998.

GREENE, F. L. **American Joint Committee on Cancer, manual for staging cancer.** 6th ed. Philadelphia: Springer- Verlag, 2002. p.337-346.

GRIGNON, D.J. *et al.* p53 status and prognosis of locally advanced prostatic adenocarcinoma: a study based on RTOG 8610. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v.89 n.2, p. 158165, 1997.

GU, K. *et al.* Overexpression of her-2/neu in human prostate cancer and benign hyperplasia. **Cancer Lett.**, Washington, v.99, p.185-189, 1996.

GUILLAUD, P.; DU MANOIR, S.; SEIGNEURIN, D. Quantification and topographical description of Ki-67 antibody labelling during the cell cycle of normal fibroblastic (MRC-5) and mammary tumour cell lines (MCF-7). **Anal. Cell Pathol.**, Amsterdam, v.1, p.25-39, 1989.

HALL, M.C. *et al.* Significance of tumour angiogenesis in clinically localized prostate carcinoma treated with external beam radiotherapy. **Urology**, Ridgewood, v.44, p.869-875, 1994.

HALVORSEN, O. *et al.* Independent prognostic importance of microvessel density in clinically localized prostate cancer. **Anticancer Res.**, Athens, v.20, p.3791-3799, 2000.

HALVORSEN, O.J.; HAUKAAS, S.A.; AKSLEN, L.A. Combined loss of PTEN and p27 expression is associated with tumor cell proliferation by Ki-67 and increased risk of recurrent disease in localized prostate cancer. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v.9, n.4, p.1474-9, 2003.

HAMILTON, R.J.; FREDLAND, S.J. Review of recent evident in support of a role for statin in the prevention of prostate cancer. **Curr. Opin. Urol.**, London, v.18, p. 333-339, 2008.

HAN, M. *et al.* Biochemical (prostate specific antigen) recurrence probability following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. **J. Urol.**, Baltimore, v.169, p.517–523, 2003.

HOLT, S.K.; SALINAS, C.A.; STANFORD, J.L. Vasectomy and the risk of prostate cancer. **J.Urol.**, Baltimore, v.180, n.6, p.2567-2568, 2008.

HUSSAIN, S. *et al.* Secular trends in prostate cancer mortality, incidence and treatment: England and Wales, 1975-2004. **BJU Int.**, London, v. 101, p.547-555, 2008.

IZAWA, J.I.; DINNEY, C.P.N. The role of angiogenesis in prostate and other urologic cancer: a review. **JAMC**, Abbottabad, v.164, n.5, p.663-670, 2001.

JAGGI, M. *et al.* E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase $\text{c}\mu$ is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer. **Cancer Res.**, Baltimore, v.65, n.2, p.483-492, 2005.

JIN, S. P53, autophagy and tumor supression. **Autophagy**, Georgetown, v.1, n.3, p.171-173, 2005.

JORDA, M. *et al.* HER2 expression in prostatic cancer: a comparison with mammary carcinoma. **J. Urol.**, Baltimore, v.168, p.1412-1414, 2002.

KHATAMI, A. *et al.* Is tumor vascularity in prostate core biopsies a predictor of PSA recurrence after radical prostatectomy? **Acta Oncol.**, Stockholm, v.44, n.4, p.362-368, 2005.

KHATAMI, A. *et al.* Ki-67 in screen-detected, low-grade, low-stage prostate cancer, relation to prostate-specific antigen doubling time, Gleason score and prostate-specific antigen relapse after radical prostatectomy. **Scand. J. Urol. Nephrol.**, Stockholm, v.43, n.1, p.12-18, 2009.

KATTAN, M.W. *et al.* A preoperative nomogram for disease recurrence following radical prostatectomy for prostate cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v.90, p.766–771, 1998.

KAUR, M.; AGARWAL, R.; AGARWAL, C. Grape seed extract induces anoikis and caspase-mediated apoptosis in human prostate carcinoma LNCaP cells; possible role of ataxia telangiectasia mutated-p53 activation. **Mol.Cancer.Ther.**, Philadelphia, v.5, p.1265-1274, 2006.

KLEIN, E.A. *et al.* Surgeon experience in strongly associated with biochemical recurrence after radial prostatectomy for all preoperative risk categories. **J.Urol.**, Baltimore, v.179, p.2212-2217, 2008.

KÖKSAL, I.T. *et al.* Expression of E-cadherin in prostate cancer in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: correlation with pathological features. **Pathology**, Sidney, v.34, p.233-238, 2002.

KONISHI, N. *et al.* High expression of a new marker PCA-1 in human prostate carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v.11, n.14, p.5090-5097, 2005.

KRAHN, M.D.; NAM, R.K.; JEWETT, M.A.S. Prostate cancer: 2. Natural history. **CMAJ**, Ottawa, v.159, p.695-691, 1998.

KRUPSKI, T. *et al.* Microvessel density, p53, retinoblastoma, and chromogranin A immunohistochemistry as predictors of disease-specific survival following radical prostatectomy for carcinoma of the prostate. **Urology**, Ridgewood, v.55, p.743-749, 2000.

KUEFER, R. *et al.* The role of 80 fragment of e-cadherin in metastatic progression of prostate cancer. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v.9, p.6447-6452, 2003.

KUO, N.W.; LIN, H.C.; LEE, H.C. Physician clinical experience and inappropriate prostate specif antigen screening: evidence from an Asian country. **J. Urol.**, Baltimore, v.180, p.1954-1958, 2008.

KVALE, R. *et al.* Interpreting trends in prostate cancer incidence and mortality in the five nordic countries. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v.99, p.1881-1887, 2007.

LARA, P.N.J.R. *et al.* HER-2/neu is overexpressed infrequently in patients with prostate carcinoma. **Cancer**, Philadelphia, v.94, p.2584-2589, 2002.

LEIROS, G.J. *et al.* Detection of human papillomavirus DNA and p53 codon 72 polymorphism in prostate carcinomas of patients from Argentina. **BMC Urol.**, London, v.5, p.1-7, 2005.

LESSARD, L. *et al.* NF-kB nuclear localization and its prognostic significance in prostate cancer. **BJU Int. Urol.**, London, v.91, p.417-420, 2003.

LINDSTROM, L.S. *et al.* Familial concordance in cancer survival: a Swedish population-based study. **Lancet Oncol.**, London, v.8, p.1001-1006, 2007.

LINE, B.R. *et al.* Targetin tumor angiogenesis: comparison of peptide and polymer-peptide conjugates. **J. Nucl. Med.**, New York, v.46, n.9, p. 1552-1560, 2005.

LISKA, J. *et al.* Prostate tumours histological classification and molecular aspects of prostate tumorigenesis. **Endocr. Regul.**, Bratislava, v.41, p.45-57, 2007.

LUGHETTI, P. **Identificação de marcadores moleculares associados com a susceptibilidade ao desenvolvimento do carcinoma de próstata em pacientes brasileiros.** Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MCLOUGHLIN, J. *et al.* Evaluation of Ki-67 monoclonal antibody as prognostic indicator for prostatic carcinoma. **Br. J. Urol.**, London, v.72, p.92-97, 1993.

MAKAROV, D.V. *et al.* Updated monogram to predict pathologic stage of prostate cancer given prostate-specific antigen level, clinical stage, and biopsy Gleason score (partin tables) based on cases from 2000 to 2005. **Urology**, Ridgewood, v.69, p.1095– 1101, 2007.

MCNEAL, J.E. Cancer volume and site of origin of adenocarcinoma of the prostate. Relationship to local and distant spread. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v.23, p.258-266, 1992.

MOHAPATRA, S. *et al.* Accumulation of p53 and reductions in XIAP abundance promote the apoptosis of prostate cancer cells. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 65, p.7717-7723, 2005.

MORRIS, M.J.; REUTER, V.E.; KELLY, W.V. HER2 profiling and targeting in prostate carcinoma, a phase II trial of trastuzumab alone and with paclitaxel. **Cancer**, Philadelphia, v.94, p.980-986, 2002.

MOUL, J.W. Angiogenesis, p53, bcl-2 and Ki-67 in the progression of prostate cancer after radical prostatectomy. **Eur Urol.**, Basel, v.35, n.5-6, p.399-407, 1999.

MUCCI, N.R. *et al.* Expression of nuclear antigen Ki-67 in prostate cancer needle biopsy and radical prostatectomy specimens. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v.92, p.1941-1942, 2000.

MULLER, H. *et al.* Evaluation of serum and urinary myeloid related protein-14 as a marker for early detection of prostate cancer. **J.Urol.**, Baltimore, v.180, p1309-1313, 2008.

MYERS, R.B. *et al.* Expression of p160erbB-3 and p185erbB-2 in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v.86, p.1140-1145, 1994.

NARICULAN, J. *et al.* Utility of tissue microarrays for profiling prognostic biomarkers in clinically localized prostate cancer: the expression of BCL-2, E-cadherin, Ki-67 and p53 as predictors of biochemical failure after radical prostatectomy with nested control for clinical and pathological risk factors. **Asian J. Androl.**, Beijing, v. 11, n.1, p.109-118, 2009.

NEAL, D.E. Can we accurately identify men with low risk prostate cancer ? **J.Urol.**, Baltimore, v.180, p.1217-1218, 2008.

NELSON, W.G. Prostate cancer prevention. **Curr. Opin. Urol.**, London, v.17, p. 157-167, 2007.

NGUYEN, P.L. *et al.* The impact of Skp2 overexpression on recurrence-free survival following radical prostatectomy. **Urol. Oncol.** 2009 May 16. [Epub ahead of print]

OJEA CALVO, A. *et al.* Utilidad de la expresión de Ki-67 en las biopsias preoperatorias para predecir la recidiva bioquímica del cáncer de próstata después de la prostatectomía radical. **Actas Urol. Esp.**, Madrid, v.28, p.650-660, 2004.

PAN, C.C. *et al.* The prognostic significance of tertiary Gleason patterns of higher grade in radical prostatectomy specimens: A proposal to modify the Gleason grading system. **Am. J. Surg. Pathol.**, Philadelphia, v.24, p.563–569, 2000.

PANG, R.W.C.; POON, R.T.P. Clinical implication of angiogenesis in cancers. **Health Risk Man**, Abingdon, v.2, n.2, p.97-108, 2006.

PARTIN, A.W. *et al.* Prostate specific antigen in the staging of localized prostate cancer: influence of tumor differentiation, tumor, volume and benign hyperplasia. **J.Urol.**, Baltimore, v.143, p.747-752, 1990.

PARTIN, A.W. *et al.* The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. **J. Urol.**, Baltimore, v.150, p.110-114, 1993.

PARTIN, A.W. *et al.* Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millennium. **Urology**, Ridgewood, v.58, p.843–848, 2001.

PEGORETTO, F.R. **Valor prognóstico da expressão imuno-histoquímica tecidual do c-erbB-2, da e-caderina e do MIB-1 no adenocarcinoma de prostate clinicamente localizado.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

PENSON, D.F.; CHAN, J.M. Prostate cancer. **J. Urol.**, Baltimore, v.177, p.2020-2029, 2007.

POPESCU, N.C.; KING, C.R., KRAUS, M.H. Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. **Genomics**, San Diego, v.4, p.362-366, 1989.

POUND, C.R. *et al.* Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. **JAMA**, Chicago, v.281, p.1591, 1999.

PRESS, M.F. *et al.* HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node negative breast carcinomas. **J. Clin. Oncol.**, Tokyo, v.15, p.2894-2904, 1997.

RAFTERY, D.; GOWDA, G.A.N. An approaching new wave of multicomponent biomarker diagnostics? **J. Urol.**, Baltimore, v.179, p.2089-2090, 2008.

RAMPERSAUD, E.N. *et al.* Percent tumor involvement and risk of biochemical progression after radical prostatectomy. **J. Urol.**, Baltimore, v.180, p. 571-576, 2008.

RAMSEY, S.D. *et al.* On the importance of race, socioeconomic status and comorbidity when evaluating quality of life in men with prostate cancer. **J. Urol.**, Baltimore, v.177, p.1992-1999, 2007.

REES, M.A.; RESNICK, M.I.; OESTERLING, J.E. Use of prostate specific antigen. Gleason score, and digital rectal examination in staging patients newly diagnosed prostate cancer. **Urol. Clin. North. Am.**, Philadelphia, v.24, p.379-388, 1997.

REVELOS, K. *et al.* p 27(kip1) and Ki-67 (MIB1) immuno-histochemical expression in radical prostatectomy specimens of patients with clinically localized prostate cancer. **In Vivo**, Athens, v.19, n.5, p.911-930, 2005.

REVELOS, K. *et al.* Correlation of androgen receptor status, neuroendocrine differentiation and angiogenesis with time-to-biochemical failure after radical prostatectomy in clinically localized prostate cancer. **Anticancer Res.**, Athens, v.27, n.5B, p.3651-60, 2007.

RHODES, D.R. *et al.* Multiplex biomarkers approach for determining risk of prostate-specific antigen-defined recurrence of prostate cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v.95, p.661-668, 2003.

RIBAL, M.J. *et al.* Low p27 expression predicts biochemical relapse after radical prostatectomy in patients with clinically localized prostate cancer. **Anticancer Res.**, Athens, v.23, n.6D, p.5101-6, 2003

RIBEIRO, F.R. *et al.* Comparison of chromosomal and array-based comparative genomic hybridization for the detection of genomic imbalances in primary prostate carcinomas. **Mol. Cancer**, London, v.5, p.1-11, 2006.

RODDAM, A.W. *et al.* Endogenous sex hormones and prostate cancer: a collaborative analysis of 18 prospective studies. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v.100, p.170-183, 2008.

ROSS, J.S. *et al.* E-cadherin expression in prostatic carcinoma biopsies: correlation with tumor grade, DNA content, pathologic stage, and clinical outcome. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v.7, p.835, 1994.

ROY, S. *et al.* Downregulation of both p21/Cip1 and p27/Kip1 produces a more aggressive prostate cancer phenotype. **Cell Cycle**, Georgetown, v.7, n.12, p.1828-35, 2008.

RUBIN, M.A. *et al.* Microvessel density in prostate cancer: lack of correlation with tumour grade, pathologic stage, and clinical outcome. **Urology**, Ridgewood, v.53, p.542-547, 1999.

RUDOLPH, P. *et al.* Determination of proliferation activity of prostate cancers by means of nuclear proliferation-associated formalin resistant Ki-S5 antigens. **Verh. Dtsch. Ges. Pathol.**, Berlin, v.77, p.98-102, 1993.

SCALE, C.D.; DAHM, P. The critical use of population-based medical databases for prostate cancer research. **Curr. Opin. Urol.**, London, p.320-325, 2008.

SEBO, T.J. *et al.* Perineural invasion and MIB-1 positivity in addition to Gleason score are significant preoperative predictors of progression after radical retropubic

prostatectomy for prostate cancer. **Am. J. Surg. Pathol.**, Philadelphia, v.26, p.431-439, 2002.

SHAFFER, D.R. *et al.* Evidence for a p27 tumor suppressive function independent of its role regulation cell proliferation in the prostate. **PNAS**, Washington, v.102, p.210-215, 2005.

SHAND, R.L.; GELMANN, E.P. Molecular biology of prostate-cancer pathogenesis. **Curr. Opin. Urol.**, London, v.16, p.123-131, 2006.

SHARIAT, S.F. *et al.* Potentially harmful effect of a testosterone dietary supplement on prostate cancer growth and metastasis. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v.168, p.235-236, 2008a.

SHARIAT, S.F.; *et al.* Inventory of prostate cancer predictive tools. **Curr. Opin. Urol.**, London, v.18, p. 279-296, 2008b.

SIGNORETTI, S. *et al.* Her-2-neu expression and progression toward androgen independence in human prostate cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v.92, p.1918-1925, 2000.

SIMONE, N.L. *et al.* Pretreatment predictors of death from other causes in men with prostate cancer **J.Urol.**, Baltimore, v.180, p.2447-2452, 2008.

SONG, C. *et al.* Mass Screening for prostate cancer in Korea: a population based study. **J. Urol.**, Baltimore, v. 180, p.1949-1953, 2008.

STACKHOUSE, G.B. *et al.* p53 and bcl-2 immunohistochemistry in pretreatment prostate needle biopsies to predict recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy. **J.Urol.**, Baltimore, v.162, p.2040-2045, 1999.

STAMEY, T.A.; MCNEAL, J.E.; YEMOTO, C.M. Biological determinants of cancer progression in men with prostate cancer. **JAMA**, Chicago, v.281, p.1395–400, 1999.

STANTON, A.G. **Primer of biostatistics** .4th .ed. New York: McGraw Hill, 1997.

STATIN, P. *et al.* Cell proliferation assessed by Ki-67 immunoreactivity on formalin fixed tissues is a predictive factor for survival in prostate cancer. **J. Urol.**, Baltimore, v.157, p.219-222, 1997.

STATIN, P. *et al.* Surveillance and deferred treatment for localized prostate cancer. Population based study in the national prostate cancer register of Sweden. **J. Urol.**, Baltimore, v.180, p.2423-2430, 2008.

STEINBERG, G.D. *et al.* Family history and the risk of prostate cancer. **Prostate**, New York, v.17, p.337-347, 1990.

STROHMEYER, D. *et al.* Tumour angiogenesis is associated with progression after radical prostatectomy in pT2/pT3 prostate cancer. **Prostate**, New York, v.42, p.26-33, 2000.

TAFTACHI, R. *et al.* Proliferating-cell nuclear antigen (PCNA) as an independent prognostic marker in patients after prostatectomy: a comparison of PCNA and Ki-67. **BJU Int.**, London, v.95, p.650-654, 2005.

TAILLE, A. *et al.* Microvessel density as a predictor of PSA recurrence after radical prostatectomy. **Am. J. Clin. Pathol.**, Baltimore, v.113, p.555-562, 2000.

TAMBOLI, P. *et al.* Comparative analysis of the nuclear proliferative index (Ki-67) in benign prostate, prostatic intraepithelial neoplasia, and prostatic carcinoma. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v.9, p.1015-1019, 1996.

TAVERNA, G. *et al.* Fractal analysis of two-dimensional vascularity in primary prostate cancer and surrounding non-tumoral parenchyma. **Pathol. Res. Pract.** 2009 Feb 19 Epub ahead of print.

TEETER, A.E. *et al.* What are the factors associated with short prostate specific antigen doubling time after radical prostatectomy? A report from SEARCH database group. **J. Urol.**, Baltimore, v.180, p.1980-1985, 2008.

THOMPSON, I. *et al.* Guidelines for the management of clinically localized prostate cancer; 2007 update. **J. Urol.**, Baltimore, v.177, p.2106-2131, 2007.

TROJAN, L. *et al.* Expression of different vascular endothelial markers in prostate cancer and BPH tissue: an immunohistochemical and clinical evaluation. **Anticancer Res.**, Athens, v.24, n.3a, p.1651-1666, 2004.

TRUE, L. *et al.* A molecular correlate to the Gleason grading system for prostate adenocarcinoma. **PNAS**, Washington, v.103, n.29, p.10991-10996, 2006.

TSUCHIYA, A.; ZHANG, G.J.; KANNO, M. Prognostic impact of cyclindependent kinase inhibitor p27kip1 in node-positive breast cancer. **J. Surg. Oncol.**, New York, v.70, n.4, p.230-234, 1999.

VAN PATTERN, C.L.; DE BOER, J.G.; GUNS, E.S.T. Diet and dietary supplement intervention trails for the prevention of prostate cancer recurrence: a review of the randomized controlled trial evidence. **J. Urol.**, Baltimore, v.180, p.2314-2322, 2008.

VICKERS, A.J. *et al.* A panel of kallikrein markers can reduce unnecessary biopsy for prostate cancer: data from the European randomized study of prostate cancer screening in Goteborg, Sweden. **BMC Med.**, London, v.6, n.19, p.1-10, 2008.

VIEWEG, J. Prostate cancer: target complexity. **Curr. Opin.Urol.**, London, v.18, p.261-262, 2008.

VIS, A.N. *et al.* Prognostic value of cell cycle proteins p27kip1 and MIB-1, and the cell adhesion protein CD44s in surgically treated patients with prostate cancer. **J. Urol.**, Baltimore, v.164, p.2156-2161, 2000.

WALSH, P.C. Anatomic radical prostatectomy: evolution of the surgical technique. **J. Urol.**, Baltimore, v.160, n.6 Pt 2, p.2418-24, 1998.

WHEELLOCK, M.J.; JOHNSON, K. R. Cadherins as modulators of cellular phenotype. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, Palo Alto, v.19, p.207, 2003.

WHITMAN, J. *et al.* PCA3 score before radical prostatectomy predicts extracapsular extension and tumor volume. **J. Urol.**, Baltimore, v.180, p.1975-1979, 2008.

WU, A.K. *et al.* Health related quality of life in patients treated with multimodal therapy for prostate cancer. **J. Urol.**, Baltimore, v.180, p.2415-2422, 2003.

WILT, T.J. *et al.* Association between hospital and surgeon radical prostatectomy volume and patients outcomes: a systematic review. **J. Urol.**, Baltimore, v.180, p.820-829, 2008a.

WILT, T.J. *et al.* Systematic review: comparative effectiveness and harms of treatments for clinically localized prostate cancer. **Ann. Intern. Med.**, Chicago, v.148, n.6, p.435-48, Mar. 2008b.

YANG, R.M. *et al.* Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer. **J. Urol.**, Baltimore, v.159, p.941-945, 1998.

YU, D.S. Apoptosis-related markers for predicting progression of prostate cancer. **J. Chin. Med. Assoc.**, v.70, p.3, 2007.

ZELLWEGER, T. *et al.* Tumour growth fraction measured by immunohistochemical staining of Ki67 is an independent prognostic factor in preoperative prostate biopsies with small-volume or low-grade prostate cancer. **Int. J. Cancer**, New York, v.124, n.9, p.2116-2123, 2009.

ZHAO, R. *et al.* Expression of p53 enhances selenite-induced superoxide production and apoptosis in human prostate cancer cells. **Cancer Res.**, Baltimore, v.15, p.2296-2304, 2006.

ZHENG, X.Y. *et al.* Correlation of Skp2 and P27kip1 protein expression and clinicopathological features of prostate cancer. **Ai Zheng.**, Guangzhou, v.23, n.2, p.215-218, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

TABELA 1 - EXPRESSÃO DO MARCADOR MIB-1

EXPRESSÃO	NÚMERO	PERCENTUAL
Negativo	63	63,0
Positivo	37	37,0
TOTAL	100	100,0

$p < 0,0001$ (Proporção)

APÊNDICE 2

TABELA 2 - EXPRESSÃO DO MARCADOR P27

EXPRESSÃO	NÚMERO	PERCENTUAL
Negativo	60	60,0
Positivo	40	40,0
TOTAL	100	100,0

$p = 0,007$ (Proporção)

APÊNDICE 3

AVALIAÇÃO DEMOGRÁFICA DOS PACIENTES ESTUDADOS

DADOS	NÚMERO (n = 100)	%	DADOS	NÚMERO (n = 100)	%
FAIXA ETÁRIA (anos)			OUTROS ACHADOS		
Até 49	04	4,0	Margem Uretral	06	6,0
50 a 59	20	20,0	Margem Vesical	01	1,0
60 a 69	58	58,0	Invasão Angiolinfática	11	11,0
70 e mais	18	18,0	Vesícula Seminal	06	6,0
PSA (ng/dl)			MARCADORES		
Menor que 4,0	11	11,0	MIB-1	37	37,0
4,0 a 9,9	70	70,0	P27	40	40,0
10,0 a 19,9	13	13,0			
20,0 ou maior	06	6,0			
PSA CONTROLE					
Recidiva (N)	12	12,0			
Cura (S)	74	74,0			
Margem Cura (SN)	14	14,0			
ESCORE DE GLEASON					
Até 6	72	72,0			
7	26	26,0			
8 e mais	02	2,0			
ESTADIO PATOLÓGICO					
pT1a	08	8,0			
pT2a	18	18,0			
pT2b	04	4,0			
pT2c	65	65,0			
pT3a	01	1,0			
pT3b	04	4,0			

APÊNDICE 4

ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS DADOS EM RELAÇÃO AO MARCADOR MIB1

VARIÁVEIS	Nº	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA	VALOR DE p ⁽¹⁾
PSA (ng/dl)	100	7,8	4,5	2,3	24,0	6,5	0,031
Negativo	63	7,1	3,8	2,3	24,0	6,3	
Positivo	37	9,1	5,2	2,7	23,5	8,3	
ESCORE DE GLEASON	100	6,3	0,5	5,0	8,0	-	<0,0001 ⁽²⁾
Negativo	63	6,1	0,4	5,0	8,0	-	
Positivo	37	6,5	0,6	5,0	8,0	-	
TEMPO DE SEGUIMENTO (meses)	100	36,7	18,8	16,7	108,7	33,6	0,037
Negativo	63	34,3	17,3	16,7	106,6	31,2	
Positivo	37	40,8	20,6	20,4	108,7	34,6	
CD34 (ÁREA) - NORMAL	100	9,3	2,8	4,0	14,0	9,0	0,771
Negativo	63	9,2	2,9	4,0	14,0	9,0	
Positivo	37	9,4	2,6	4,0	14,0	9,0	
CD34 (ÁREA) - TUMOR	100	46,1	18,5	18,0	91,0	40,5	<0,0001
Negativo	63	41,4	17,4	19,0	84,0	36,0	
Positivo	37	53,9	17,8	18,0	91,0	57,0	
CD34 - TUMOR / NORMAL (Proporção)	100	5,4	2,7	1,6	16,5	4,9	0,012
Negativo	63	4,9	2,3	1,6	13,8	4,6	
Positivo	37	6,3	3,1	2,3	16,5	5,7	

NOTA: Desvio padrão muito elevado, recomenda-se utilizar a mediana.

(1) Mann-Whitney; (2) t de Student.

APÊNDICE 5

AVALIAÇÃO DOS DADOS EM RELAÇÃO AO MARCADOR P27

DADOS	NEGATIVO (n = 40)		POSITIVO (n = 60)		TOTAL (n = 100)		VALOR DE p ⁽¹⁾
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
PSA (ng/dl)							0,117
Menor que 4,0	04	10,0	07	11,7	11	11,0	
4,0 a 9,9	24	60,0	46	76,7	70	70,0	
10,0 a 19,9	09	22,5	04	6,6	13	13,0	
20,0 ou maior	03	7,5	03	5,0	06	6,0	
ESCORE DE GLEASON							0,015
Até 6	23	57,5	49	81,7	72	72,0	
7	15	37,5	11	18,3	26	26,0	
8 e mais	02	5,0	-	-	02	2,0	
ESTADIO PATOLÓGICO							0,506
pT1a	04	10,0	04	6,7	08	8,0	
pT2a	07	17,5	11	18,3	18	18,0	
pT2b	01	2,5	03	5,0	04	4,0	
pT2c	28	70,0	37	61,7	65	65,0	
pT3a	-	-	01	1,6	01	1,0	
pT3b	-	-	04	6,7	04	4,0	
EVOLUÇÃO DO PSA (PSA Controle)							0,609
Cura	28	70,0	46	76,7	74	74,0	
Recidiva	12	30,0	14	23,3	26	26,0	
MARCADOR MIB1	15	37,5	22	36,7	37	37,0	0,899

(1) Qui-Quadrado.

APÊNDICE 6

AVALIAÇÃO DOS DADOS EM RELAÇÃO A EVOLUÇÃO DO PSA

DADOS	CURA (n = 74)		RECIDIVA (n = 26)		TOTAL (n = 100)		VALOR DE p ⁽¹⁾
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
FAIXA ETÁRIA (anos)							0,220
• Até 49	02	2,7	02	7,7	04	4,0	
• 50 a 59	16	21,6	04	15,4	20	20,0	
• 60 a 69	40	54,1	18	69,2	58	58,0	
• 70 e mais	16	21,6	02	7,7	18	18,0	
PSA (ng/dl)							0,023
• Menor que 4,0	09	12,2	02	7,7	11	11,0	
• 4,0 a 9,9	56	75,7	14	53,8	70	70,0	
• 10,0 a 19,9	07	9,4	06	23,1	13	13,0	
• 20,0 ou maior	02	2,7	04	15,4	06	6,0	
ESCORE DE GLEASON							0,344
• Até 6	56	75,7	16	61,5	72	72,0	
• 7	17	23,0	09	34,6	26	26,0	
• 8 e mais	01	1,3	01	3,9	02	2,0	
ESTADIO PATOLÓGICO							0,204
• pT1a	07	9,5	01	3,9	08	8,0	
• pT2a	16	21,6	02	7,7	18	18,0	
• pT2b	02	2,7	02	7,7	04	4,0	
• pT2c	46	62,2	19	73,1	65	65,0	
• pT3a	-	-	01	3,8	01	1,0	
• pT3b	03	4,0	01	3,8	04	4,0	
MARCADORES							
• MIB1	24	32,4	13	50,0	37	37,0	0,174
• P27	46	62,2	14	53,8	60	60,0	0,609

(1) Qui-Quadrado;

APÊNDICE 7

CORRELAÇÃO DOS DADOS EM RELAÇÃO O MARCADOR **CD34 - ÁREA TUMOR**

DADOS	CORRELAÇÃO (r)	VALOR DE p	SIGNIFICÂNCIA
IDADE (anos)	- 0,0724	0,474	NS
PSA (ng/dl)	+ 0,6307	<0,0001	S
ESCORE DE GLEASON			
Valor 1	+ 0,2153	0,031	S
Valor 2	+ 0,5115	<0,0001	S
Total	+ 0,5726	<0,0001	S
ESTADIO PATOLÓGICO	+ 0,3305	<0,0001	S
TEMPO DE SEGUIMENTO (meses)	+ 0,1179	0,243	NS
CD34 - ÁREA NORMAL	+ 0,1936	0,054	NS

NOTA: Análise de Correlação.

ANEXOS

ANEXO 1**Colocar a autorização do CEP**

CEP/IC/UFPR

**2ª VIA**

Curitiba, 29 de fevereiro de 2008.

Ilmo (a) Sr. (a)
Aissar Eduardo Nassif
neste

Prezado Pesquisador:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DOS FATORES PROGNÓSTICOS – IMUNOHISTOQUÍMICOS EM PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIA DE PRÓSTATA SUBMETIDOS À PROSTATECTOMIA RADICAL", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 26 de fevereiro de 2008. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0011.0.208.000-07
Registro CEP: 251.EXT.006/2008-02

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 29 de agosto de 2008.

Atenciosamente,

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Renato Tambara Filho'.

Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

ANEXO 2

ESTADIAMENTO TNM (2002)

T	TUMOR PRIMÁRIO
TX	TUMOR NÃO AVALIADO
T0	SEM EVIDÊNCIA DE TUMOR
<u>T1 TUMOR NÃO APARENTE, NÃO PALPÁVEL E NÃO IDENTIFICÁVEL POR EXAMES DE IMAGEM</u>	
T1A	TUMOR DE ACHADO INCIDENTAL COM ATÉ 5% DE NEOPLASIA NO TECIDO RESSECADO
T1B	TUMOR DE ACHADO INCIDENTAL > 5% DE NEOPLASIA NO TECIDO RESSECADO
T1C	TUMOR IDENTIFICADO NA BIÓPSIA PROSTÁTICA INDICADA POR ALTERAÇÃO DE PSA
<u>T2 TUMOR PALPÁVEL, CONFINADO À PRÓSTATA</u>	
T2A	TUMOR COMPROMETE MENOS DA METADE DE UM LOBO
T2B	TUMOR COMPROMETE MAIS DA METADE DE UM LOBO
T2C	TUMOR COMPROMETE AMBOS OS LOBOS
<u>T3 TUMOR ULTRAPASSA A CÁPSULA PROSTÁTICA</u>	
T3A	EXTENSÃO EXTRACAPSULAR UNILATERAL OU BILATERAL
T3B	INVASÃO DAS VESÍCULAS SEMINAIS
T4	TUMOR FIXO COM INVASÃO DE ESTRUTURAS ADJACENTES: COLO VESICAL, ESFINCTER EXTERNO, RETO, MÚSCULO ELEVADOR DO ÂNUS E/OU PAREDE PÉLVICA
<u>N LINFONODOS REGIONAIS</u>	
NX:	LINFONODOS REGIONAIS NÃO AVALIADOS
N0	LINFONODOS REGIONAIS SEM METÁSTASES
N1	LINFONODOS REGIONAIS COMPROMETIDOS
<u>M METÁSTASES À DISTÂNCIA</u>	
MX	METÁSTASES NÃO AVALIADAS
M0	AUSÊNCIA DE METASTASES À DISTANCIA
M1	PRESENÇA DE METÁSTASES A DISTÂNCIA
M1A	COMPROMETIMENTO DE LINFONODOS EXTRA-REGIONAIS
M1B	METÁSTASES ÓSSEAS
M1C	METÁSTASES EM OUTROS ORGÃOS

ANEXO 3

HEMATOXILINA E EOSINA

Coloração Hematoxilina e Eosina

Técnica:

- 1) Lavar em água corrente;
- 2) corar em solução de hematoxilina de Harris por 50 segundos;
- 3) lavar em água corrente;
- 4) água amoniacal;
- 5) corar em solução de eosina;
- 6) lavar, desidratar, diafanizar e montar.

Soluções:

A. Hematoxilina de Harris:

- hematoxilina - 5 g;
- álcool etílico - 50 ml;
- alúmen de potássio - 100 g;
- água destilada - 950 ml;
- óxido de mercúrio - 2,5 g;
- ácido acético glacial - 40 ml.

Dissolver a hematoxilina no álcool levemente aquecido (56°C) em banhomaria;

dissolver o alúmen de potássio em água destilada aquecida em chama, acrescentar a solução alcóolica de hematoxilina e deixar ferver. Adicionar o óxido de mercúrio e então o ácido acético. Filtrar.

IMUNO-HISTOQUÍMICA

1. Os cortes histológicos foram desparafinizados e hidratados em concentrações decrescentes de etanol e lavados em água destilada.
2. O material foi colocado em uma solução de citrato (pH = 6,0) e levado ao forno de microondas em temperatura média-máxima por 15 minutos, sendo após retirado e deixado em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos.
3. Após adicionar sobre o material uma solução tampão PBS (phosphate buffered saline) (pH = 7,6) procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena, incubando-se os cortes em uma solução a 3% de peróxido de hidrogênio em metanol, por 30 minutos à temperatura ambiente.
4. Em seguida, procedeu-se um ciclo de lavagem com água destilada e incubou-se o material por 30 minutos numa solução contendo 4% de soro normal em PBS.
5. O anticorpo específicos (DO-7, Dako[®] A/s, Dinamarca), foram preparados a uma diluição 1:250 em PBS e incubado com os cortes durante 12 horas em câmara úmida. Após um novo ciclo de lavagens os cortes foram novamente colocados em câmara úmida para a incubação, por 30 minutos, com o anticorpo secundário biotilado de camundongo anti-IgG (Vectastain, Vector Lab[®], CA, USA) diluído 1:600 em PBS. Após outro ciclo de lavagens, o material foi incubado em câmara úmida por 60 minutos com o complexo avidina/biotina (Strepto ABC, Vectastain, Vector Lab[®]. CA, USA), com diluição 1:800 em PBS.
6. A coloração da reação da imunoperoxidase foi realizada por meio da imersão, por 8 minutos, em uma solução contendo o cromógeno DAB (tetra-hidrocloreto de 3,5-diamino-benzidina) e peróxido de hidrogênio. Após lavar em água corrente foi realizada a contra coloração com hematoxilina de Harris (Merck[®], Darmstadt, Alemanha), por 2 minutos.

ANEXO 3

ANEXO 3

Nº	PAC	Idade	PSA	PSA controle	Gleason	Estádio Patológico	Peso (g)	Margem uretral	Margem vesical	Invasão angiolinfática	MIB1	P27	CD 34 Área normal	CD 34 Tumor
1	JB	60	9,2	0,20	3+3	pT2b	48,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	5	46
2	EB	59	10,8	0,53	3+3	pT2b	40,0	Neg	Neg	Ausente	Pos	Neg	8	59
3	ARM	47	8,8	0,10	3+3	pT2c	34,0	Neg	Neg	Presente	Neg	Pos	6	41
4	AM	75	4,9	<0,04	3+3	pT2b	35,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	13	30
5	CJLR	51	8,6	<0,04	3+3	pT2c	27,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	8	41
6	JRL	52	3,3	<0,04	3+4	pT2c	34,0	Neg	Neg	Ausente	Pos	Pos	11	63
7	MR	67	3,9	<0,04	3+4	pT2c	37,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	8	65
8	AC	73	9,0	0,22	3+3	pT2c	36,0	Pos	Neg	Ausente	Neg	Neg	12	82
9	FMV	74	7,3	<0,04	3+5	pT2c	42,0	Neg	Neg	Presente	Neg	Pos	7	78
10	FR	49	6,6	0,13	3+3	pT3b	23,0	Neg	Pos	Presente	Neg	Neg	9	64
11	MDO	67	4,5	<0,04	2+3	pT2c	46,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	4	20
12	NG	73	11,0	<0,04	3+4	pT2c	64,0	Neg	Neg	Ausente	Pos	Pos	11	81
13	AB	68	8,2	0,10	3+3	pT2c	47,0	Neg	Neg	Presente	Neg	Neg	13	79
14	AAOG	61	5,5	<0,04	3+3	pT2c	35,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	7	28
15	AFM	65	5,4	<0,04	3+3	pT2a	42,3	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	5	32
16	AFS	67	3,8	<0,04	4+3	pT2c	26,5	Neg	Neg	Ausente	Pos	Neg	4	31
17	AF	71	7,6	<0,04	3+3	pT2c	41,6	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	6	40
18	AC	44	5,2	<0,04	3+3	pT2c	34,9	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	6	33
19	ABF	53	11,0	<0,04	3+3	pT2c	61,2	Neg	Neg	Ausente	Pos	Neg	7	69
20	AC	65	23,5	<0,04	4+3	pT2c	39,0	Neg	Neg	Ausente	Pos	Pos	12	73
21	APS	65	4,2	<0,04	3+3	pT2a	49,1	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	9	31
22	AON	51	8,0	<0,04	3+4	pT2c	28,2	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	12	82
23	AC	59	2,8	<0,04	3+3	pT2c	26,5	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	11	35
24	BR	61	20,5	1,20	3+4	pT2c	35,0	Pos	Neg	Ausente	Pos	Neg	10	91
25	BV	66	16,2	<0,04	3+3	pT3b	50,4	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	11	84
26	CPP	65	6,1	0,20	3+3	pT2c	90,1	Neg	Neg	Ausente	Pos	Neg	9	29
27	CGP	69	6,5	<0,04	3+3	pT2a	65,3	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	7	36
28	CRM	59	5,8	<0,04	3+3	pT2c	58,5	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	13	32
29	CS	65	6,1	<0,04	3+3	pT2c	55,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	12	35
30	CH	71	9,5	<0,04	3+3	pT2c	38,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	7	29
31	DQG	64	2,3	<0,04	4+3	pT2b	32,8	Neg	Neg	Presente	Neg	Pos	13	48
32	EFS	66	6,7	<0,04	3+3	pT2a	68,7	Neg	Neg	Ausente	Pos	Pos	14	35
33	ESN	58	4,9	<0,04	3+3	pT2c	29,4	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	8	43
34	ER	78	6,4	<0,04	3+3	pT2c	40,9	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	9	40
35	ECL	73	5,8	<0,04	3+3	pT1a	29,2	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	11	30
36	EAS	64	6,5	<0,04	3+3	pT2c	68,7	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	8	29
37	FB	68	5,3	<0,04	3+4	pT2c	46,2	Neg	Neg	Ausente	Pos	Neg	12	42
38	FB	66	11,9	0,30	3+5	pT2c	60,9	Neg	Neg	Ausente	Pos	Pos	13	72
39	FZ	62	8,7	<0,04	3+4	pT2c	40,0	Neg	Neg	Ausente	Pos	Neg	9	51
40	FLP	60	6,0	<0,04	3+4	pT2c	36,0	Neg	Neg	Ausente	Pos	Pos	9	57

ANEXO 3

Nº	PAC	Idade	PSA	PSA controle	Gleason	Estádio Patológico.	Peso (g)	Margem uretral	Margem vesical	Invasão angiolinfática	MIB1	P27	CD 34 Área normal	CD 34 Tumor
41	FAQ	65	10,6	0,10	3+4	pT2c	40,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	12	51
42	FM	57	4,1	<0,04	3+3	pT2a	58,2	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	13	24
43	GJS	63	22,3	0,12	3+3	pT2c	45,9	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	12	84
44	GBS	65	8,2	<0,04	3+3	pT2c	21,7	Neg	Neg	Ausente	Pos	Neg	6	43
45	HD	65	6,5	<0,04	3+3	pT2c	45,0	Neg	Neg	Ausente	Pos	Neg	7	32
46	HAE	67	7,2	<0,04	3+3	pT2c	42,5	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	13	36
47	IFS	64	6,2	10,79	3+4	pT2c	36,6	Neg	Neg	Presente	Pos	Neg	9	62
48	JAR	59	3,4	<0,04	3+4	pT2c	42,3	Neg	Neg	Presente	Pos	Neg	12	52
49	JBC	64	10,3	<0,04	3+3	pT2c	43,0	Neg	Neg	Ausente	Pos	Pos	12	61
50	JB	67	6,9	<0,04	3+3	pT2a	41,7	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	10	31
51	JCS	71	6,2	<0,04	3+3	pT2c	38,8	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	9	41
52	JRSS	60	5,5	<0,04	3+3	pT3b	50,4	Pos	Neg	Presente	Neg	Neg	8	54
53	JLL	58	20,0	1,40	4+3	pT2c	22,6	Neg	Neg	Ausente	Pos	Pos	11	77
54	JC	67	2,7	<0,04	3+3	pT2c	45,3	Pos	Neg	Ausente	Pos	Pos	8	18
55	JAS	62	11,9	<0,04	3+4	pT2c	49,5	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	13	68
56	JCC	62	5,7	0,80	3+2	pT3a	35,9	Pos	Neg	Ausente	Pos	Neg	6	38
57	JCF	56	9,2	<0,04	3+3	pT2c	39,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	8	39
58	JPS	60	6,5	0,20	3+3	pT2a	65,1	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	6	27
59	JRAF	53	3,3	0,32	3+3	pT2c	25,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	11	22
60	JTN	71	5,4	<0,04	3+4	pT2a	22,1	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	12	40
61	JZM	65	7,4	<0,04	3+3	pT2c	21,3	Neg	Neg	Ausente	Pos	Neg	10	41
62	LB	64	10,8	<0,04	3+3	pT2a	53,2	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	8	58
63	LCC	63	20,1	0,67	3+3	pT2c	32,7	Pos	Neg	Ausente	Pos	Neg	6	72
64	LL	68	9,6	<0,04	3+3	pT2c	63,0	Neg	Neg	Ausente	Pos	Neg	9	39
65	LCO	69	8,1	<0,04	3+3	pT2c	49,1	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	11	52
66	LGV	76	4,9	<0,04	3+3	pT2c	34,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	14	31
67	LRB	64	7,3	<0,04	3+4	pT2c	45,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	4	55
68	MNA	75	8,4	<0,04	3+3	pT2a	60,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	6	38
69	MPC	63	4,6	<0,04	3+3	pT1a	67,1	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	11	29
70	MM	63	6,4	<0,04	3+3	pT2c	23,7	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	8	33
71	NC	72	24,0	<0,04	3+3	pT1a	83,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	13	42
72	NRS	63	15,3	0,10	3+4	pT2c	44,8	Neg	Neg	Ausente	Pos	Neg	5	74
73	OCF	60	5,0	<0,04	3+3	pT1a	24,7	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	12	33
74	OP	66	4,6	<0,04	3+3	pT2c	30,9	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	4	29
75	OPF	58	5,1	<0,04	3+3	pT2a	68,5	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	14	32
76	PFC	57	6,0	<0,04	3+3	pT3b	29,6	Neg	Neg	Ausente	Pos	Neg	12	48
77	OS	69	6,0	<0,04	3+4	pT2c	67,4	Neg	Neg	Ausente	Pos	Neg	8	46
78	PP	66	5,0	0,14	3+3	pT2c	48,6	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	7	40
79	SIT	70	4,7	<0,04	3+3	pT1a	22,5	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	11	31

ANEXO 3

Nº	PAC	Idade	PSA	PSA controle	Gleason	Estádio Patológico	Peso (g)	Margem uretral	Margem vesical	Invasão angiolinfática	MIB1	P27	CD 34 Área normal	CD 34 Tumor
80	SOS	73	4,6	16,20	3+3	pT2c	32,8	Neg	Neg	Ausente	Pos	Neg	12	32
81	VF	69	9,1	0,08	3+3	pT1a	57,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	9	46
82	VCS	52	8,4	<0,04	3+3	pT2c	29,3	Neg	Neg	Presente	Pos	Neg	7	32
83	WAS	45	6,5	>0,04	3+3	pT2a	43,7	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	6	28
84	WGC	58	2,7	<0,04	3+3	pT2c	24,0	Neg	Neg	Ausente	Pos	Pos	8	39
85	WF	71	4,3	<0,04	3+4	pT2c	44,2	Neg	Neg	Presente	Pos	Neg	12	58
86	AAJ	58	2,3	<0,04	3+3	pT1a	37,6	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	7	23
87	ASM	67	4,9	<0,04	3+3	pT2a	42,5	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	11	31
88	ATM	64	8,3	0,12	3+4	pT2c	37,8	Neg	Neg	Ausente	Pos	Pos	8	62
89	APN	73	6,0	<0,04	3+3	pT2a	78,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	6	19
90	BXZ	73	6,0	<0,04	3+3	pT1a	52,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	13	21
91	CCZ	61	3,6	0,39	3+3	pT2a	59,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	5	19
92	DQG	63	8,4	<0,04	3+4	pT2c	46,0	Neg	Neg	Ausente	Pos	Pos	13	59
93	EEG	69	7,0	<0,04	3+3	pT2a	46,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	9	41
94	EFM	69	9,0	<0,04	3+3	pT2c	38,2	Neg	Neg	Ausente	Pos	Neg	11	40
95	FMD	64	13,0	0,08	4+3	pT2c	44,0	Neg	Neg	Ausente	Pos	Pos	12	71
96	MAP	65	6,0	<0,04	3+3	pT2a	60,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Neg	7	31
97	MAS	61	9,0	13,40	3+4	pT2c	39,0	Neg	Neg	Ausente	Neg	Pos	10	67
98	NAC	59	10,0	<0,04	3+3	pT2c	85,0	Neg	Neg	Ausente	Pos	Pos	4	66
99	PAS	59	13,4	0,10	3+4	pT2c	72,0	Neg	Neg	Ausente	Pos	Pos	9	81
100	RC	62	6,3	<0,04	3+3	pT2a	39,0	Neg	Neg	Presente	Neg	Neg	6	32